

Univerzita Karlova v Praze
3. lékařská fakulta

Disertační práce

Praha, 2019

Mgr. Markéta Dvořáková

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta

Disertační práce

Stanovení potenciálu endokrinní disrupce
včasnou identifikací vybraných látek se zdravotním rizikem,
používaných ve spotřebních výrobcích

Determination of endocrine disruption potential
by early identification of selected substances with health risk,
used in consumer products

Školitel: MUDr. Dagmar Jírová, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30. 6. 2019

MARKÉTA DVOŘÁKOVÁ

Podpis

Identifikační záznam:

Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

DVOŘÁKOVÁ, Markéta. *Stanovení potenciálu endokrinní disruptivity včasnou identifikací vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích. [Determination of endocrine disruption potential by early identification of selected substances with health risk, used in consumer products]*. Praha, 2019. 128 stran, 8 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta. Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Dagmar Jírová, CSc.

Poděkování:

Ráda bych velmi poděkovala své školitelce MUDr. Dagmar Jírové, CSc., vedoucí Centra toxikologie a zdravotní bezpečnosti ve Státním zdravotním ústavu, za odborné a metodické vedení, cenné rady v průběhu celého mého doktorského studia, připomínky při hodnocení dílčích výsledků, směřování výzkumu a za manažerskou podporu při materiálním zajištění výzkumu, který jsem prováděla pod jejím vedením. Velmi děkuji rovněž RNDr. Kristině Kejlové, PhD., vedoucí Oddělení alternativních toxikologických metod, za trpělivost, zajímavé vědecké konzultace a umožnění provádění experimentální práce v rámci chodu oddělení. Kolegyním laborantkám děkuji za pochopení a snášenlivost při vytížení laboratoří. Velice děkuji dále kolegům z Oddělení pro hodnocení expozice chemickým látkám na pracovišti, RNDr. Jaroslavu Mrázovi, CSc., za zajímavé vědecké názory a předávání zkušeností z oboru biologického monitorování expozice chemickým látkám na pracovišti a Ing. Šárce Duškové za taktéž zajímavé konzultace z hlediska analytiky chemických látek. Dále můj velký dík patří Ing. Adamovi Vavroušovi a Mgr. Václavu Ševčíkovi z Oddělení chemické bezpečnosti za jejich ochotu a spolupráci při analytických měřeních a taktéž vědecké konzultace z oboru, které napomohly k rozšíření výzkumné práce, upřesnění výsledků a směřování experimentů. Všem spoluautorům publikací děkuji za jejich přínos v oblasti endokrinní disrupce, která se stává velmi mnohostrannou problematikou vyžadující přístup, ve kterém je propojeno více oborů. Velmi děkuji RNDr. Marku Malému, CSc. za konzultace ohledně statistického hodnocení. Děkuji i své rodině za podporu a pochopení po celou délku studia. Tato práce byla podpořena prostředky z následujících grantů a prostředků podpory: MZ ČR – RVO („Státní zdravotní ústav – SZÚ, 75010330“) a "Mezinárodní konkurenceschopnost SZU ve výzkumu, vývoji a vzdělávání v alternativních toxikologických metodách", reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000860, financovaného z EFRR/ESF.

1. Obsah

1.	Obsah	6
1.1.	Seznam použitých zkratk	9
2.	Souhrn	11
2.1.	Summary	12
3.	Literární úvod a přehled dané problematiky	13
3.1.	Signalizace a syntéza steroidních hormonů	14
3.2.	Receptory - cíl endokrinních disruptorů	15
3.2.1.	Receptorové interakce	17
3.2.2.	Estrogenové receptory	19
3.2.3.	Androgenový receptor	22
3.3.	Významné zdroje endokrinních disruptorů	25
3.4.	Preventivní snižování expozice endokrinním disruptorům	27
3.5.	<i>In vitro</i> metody vhodné pro sledování endokrinního potenciálu	30
3.5.1.	Endokrinní disruptce u spotřebních výrobků a kosmetických přípravků	33
3.5.2.	Nahrazování testování <i>in vivo</i> alternativními <i>in vitro</i> metodami	34
4.	Hypotézy	35
5.	Cíle práce	36
Experimentální část		37
6.	Metodika	38
6.1.	Predikce potenciálních ligandů estrogenového receptoru <i>in silico</i>	38
6.2.	Verifikace <i>in silico</i> predikce metodou <i>in vitro</i> s využitím lidské buněčné linie (dle OECD TG 455)	38
6.3.	Identifikace estrogenního potenciálu metodou <i>in vitro</i> pomocí metody založené na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (YES)	39
6.4.	Identifikace anti-estrogenního potenciálu <i>in vitro</i> pomocí metody založené na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (anti YES)	40
6.5.	Identifikace anti-estrogenního potenciálu <i>in vitro</i> pomocí metody založené na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (anti YES)	40

6.6.	Identifikace anti-androgenního potenciálu <i>in vitro</i> pomocí metody založené na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (anti YAS)	41
6.7.	Modifikace metod založených na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (varianta XL)	41
6.8.	Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích	42
6.9.	Příprava extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru	44
6.10.	Příprava extraktů spotřebních výrobků na bázi plastu	44
6.11.	Příprava vzorků kosmetických přípravků	45
6.12.	Příprava extraktů vzorků doplňků stravy	46
6.13.	Stanovení prediktivních indikátorů expozice bisfenolům a ftalátům	48
6.14.	Porovnání efektivity intervenčních opatření pro potenciální snížení expozice bisfenolům a ftalátům	48
6.15.	Příprava informačního materiálu, vhodného pro předávání informací široké veřejnosti jako nástroj pro obor preventivní medicíny pro využití např. i v rámci klinické praxe.	50
7.	Výsledky	51
7.1.	Predikce potenciálních ligandů estrogenového receptoru <i>in silico</i>	52
7.2.	Verifikace <i>in silico</i> predikce metodou <i>in vitro</i> (OECD TG 455)	53
7.3.	Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích	55
7.4.	Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru	57
7.5.	Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi plastu	59
7.6.	Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u kosmetických přípravků různého složení	62
7.7.	Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u vzorků doplňků stravy (produktů tradiční čínské medicíny)	69
7.8.	Stanovení prediktivních indikátorů expozice bisfenolům	72
7.9.	Stanovení prediktivních indikátorů expozice ftalátům	73
7.10.	Sledování efektivity intervenčních opatření pro potenciální snížení expozice ftalátům a bisfenolům	76

7.11.	Návrh informačního materiálu, vhodného pro edukaci odborné veřejnosti a preventivní poradenství ohledně potenciálního snižování expozice ED	83
8.	Diskuse	91
8.1.	Predikce potenciálních ligandů estrogenového receptoru in silico	91
8.2.	Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích	92
8.3.	Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru, plastu, kosmetických přípravků a doplňků stravy	95
8.4.	Stanovení prediktivních indikátorů expozice bisfenolům a ftalátům	98
8.5.	Sledování efektivit intervenčních opatření pro potenciální snížení expozice bisfenolům a ftalátům	100
8.6.	Informační materiál, vhodný pro edukaci odborné veřejnosti a preventivní poradenství ohledně potenciálního snižování expozice ED	103
9.	Závěr	104
10.	Seznam literárních zdrojů	106
11.	Seznam internetových zdrojů	121
12.	Seznam obrázků	122
13.	Seznam tabulek	123
14.	Seznam grafů	124
15.	Seznam příloh	127
	Přílohy	129
	Příloha č. 1	130
	Příloha č. 2	138
	Příloha č. 3	146
	Příloha č. 4	155
	Příloha č. 5	157
	Příloha č. 6	159
	Příloha č. 7	161
	Příloha č. 8	162

1.1. Seznam použitých zkratek

5-OH MEHP	- 5-hydroxy-monoethyl hexyl phthalate (metabolit diethyl hexyl ftalátu)
5-oxo-MEHP	- 5-oxo-monoethyl hexyl , metabolit diethyl hexyl ftalátu
(h)AR	- (human) androgen receptor (lidský androgenový receptor)
(h)ER α	- (human) estrogen receptor α (lidský estrogenový receptor α)
ABS	- Akrylonitrilbutadienstyrene (termoplastický průmyslový kopolymer)
AF	- activation function (aktivační funkce)
AOP	- Adverse Outcome Pathways (dráhy škodlivého účinku)
AR	- androgen receptor (androgenový receptor)
ARE	- androgen responsive elements (androgenový responzivní element)
BBP	- benzyl butyl phthalate (benzyl butyl ftalát)
BMI	- Body Mass Index (index tělesné hmotnosti)
BPA	- bisphenol A (bisfenol A)
BPAF	- bisphenol AF (bisfenol AF)
BPAP	- bisphenol AP (bisfenol AP)
BPBP	- bisphenol BP (bisfenol BP)
BPC	- bisphenol C (bisfenol C)
BPE	- bisphenol E (bisfenol E)
BPF	- bisphenol F (bisfenol F)
BPFL	- bisphenol FL (bisfenol FL)
BPG	- bisphenol G (bisfenol G)
BPM	- bisphenol M (bisfenol M)
BPP	- bisphenol P (bisfenol P)
BPS	- bisphenol S (bisfenol S)
BPTMC	- bisphenol TMC (bisfenol TMC)
BPZ	- bisphenol Z (bisfenol Z)
cAMP	- cyclic adenosine monophosphate (cyklický adenosine monofosfát)
cGMP	- cyclic guanosine monophosphate (cyklický guanosin monofosfát)
Cr	- kreatinin
CYP	- cytochrome (skupina enzymů cytochrom P450)
ČIA	- Český institut pro akreditaci, o.p.s.
DBP	- dibutyl phthalate (dibutyl ftalát)
DEHP	- Bis(2-ethylhexyl) phthalate (diethylhexyl ftalát)
DIBP	- diisobutyl phthalate (diisobutyl ftalát)
DMSO	- dimethyl sulfoxide (rozpuštědlo)
DNA	- deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
EC	- European Commission (Evropská komise)
ECHA	- European Chemicals Agency (Evropská agentura pro chemické látky)
ED	- endocrine disruptors, disruption (endokrinní disruptory, endokrinní disrupce)
ER	- estrogen receptor (estrogenový receptor)

EU	- European Union (Evropská unie)
GPER	- G protein-coupled estrogen receptor (s G-proteiny spřažený estrogenový receptor)
HPG	- Hypothalamic–Pituitary–Gonadal (axis) (osa hypothalamus – hypofýza – gonády)
KE	- Key Events (klíčové události)
KEGG	- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kyótská encyklopedie genů a genomů)
LOQ	- Limit of Quantification (limit kvantifikace metody)
MEP	- monoethyl phthalate (metabolit diethyl hexyl ftalátu)
MBzP	- monobenzyl phthalate (metabolit benzyl butyl ftalátu)
MEHP	- monoethyl hexyl phthalate (metabolit diethyl hexyl ftalátu)
MiBP	- mono isobutyl phthalate (metabolit diisobutyl ftalátu)
MnBP	- mono butyl phthalate (metabolit dibutyl ftalátu)
MIE	- Molecular Initiating Event (molekulární iniciační událost)
MOA	- Mode of Action (způsob účinku)
MW	- Molecular Weight (molekulová hmotnost)
nm	- nanometer (nanometr)
OD	- Optical Density (optická densita)
OECD	- Organization for Economic Cooperation and Development (Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj)
PBPK	- Physiologically Based Pharmacokinetic Models (modely farmakokinetického modelování založené na fyziologii)
REACH	- Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek)
STR	- Short Tandem Repeat (krátké repetitivní sekvence DNA, tandemová opakování, mikrosatelity)
QSAR	- Quantitative Structure-Activity Relationship (kvantitativní výpočetní modely vztahu struktury a aktivity látky)
SHBG	- Steroid Hormone Binding Globulin (steroidní hormony vázající globulin)
TG	- Test guideline (Pokyny ke zkouškám)
WHO	- World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
YAS	- Yeast Estrogen Screen (kvasinkový test zaměřený na zjištění estrogenní aktivity)
YES	- Yeast Androgen Screen (kvasinkový test zaměřený za zjištění androgenní aktivity)

2. Souhrn

Látky přírodního nebo syntetického původu, schopné aktivovat nebo inhibovat funkce buněčných receptorů a tak přispívat k modulaci neuroendokrinního systému skrze dráhy hormonální signalizace (narušovat, “disruptovat” endokrinní systém), jsou v odborné literatuře nazývány “endokrinní disruptory” (ED). Endokrinní disrupce jako forma mírné systémové toxicity chemických látek a jejich směsí je intenzivně řešena na vědecké i legislativní úrovni. V roce 2018 bylo dosaženo pokroku ve vytváření uceleného legislativního rámce Evropské unie pro ED, když se podařilo dosáhnout konsensu ohledně vědeckých kritérií pro jejich posuzování a identifikaci. Evropská unie výzkum ED podporuje jako významný úkol preventivní medicíny. V rámci různých rámcových programů pro výzkum a inovace poskytla EU financování desítkám projektů a v rámci programu Horizont 2020 podpořila projekty týkající se vývoje metod vhodných pro testování ED. Do právních předpisů např. o pesticidech a biocidech, chemických látkách (nařízení REACH), zdravotnických prostředcích, kosmetických přípravcích, materiálech určených pro styk s potravinami, vodě, hračkách, a ochraně zaměstnanců na pracovišti byla ustanovení týkající se ED nově zařazena. Vzhledem k vývoji legislativy je možno očekávat i nová intervenční či preventivní opatření zaměřená na ochranu spotřebitele, zejména u látek, které mohou tvořit součást spotřebních výrobků nebo se dostávat do potravního řetězce. Toxikologické metody *in vitro* pro včasné stanovení potenciálu ED byly využívány převážně pro získání dat o toxicitě chemických látek, mohou však mít potenciál širšího využití v preventivní medicíně např. při identifikaci zdrojů ED, testování směsí (resp. extraktů ze spotřebních výrobků), biologických vzorků při prevenci a monitoringu expozice ED, při získávání mechanistických dat prokazujících potenci vzorků v konkrétních koncentracích, ve srovnání s látkami se známými farmakokinetickými parametry. Běžná populace je vystavena směsím mnoha látek ve velmi nízkých koncentracích, pocházejících ze všech složek životního prostředí, různých odvětví průmyslu, z potravin a spotřebních výrobků. Stále se hledají odpovědi na otázku, zda hlavně individuální aktivita konkrétních látek v určité koncentraci nebo i kombinované účinky více látek v nízkých koncentracích jsou zodpovědné za rozvoj škodlivých účinků. Přístupy k posuzování rizika pro člověka se stále vyvíjejí, zejména v kontextu realistické úrovně expozice ED, biologické dostupnosti, metabolické (de)aktivace a eliminace. Hlavním trendem v oblasti legislativy a regulace v EU je princip předběžné opatrnosti, kdy expozice člověka ED by se měla preventivně snižovat. Pro ten účel by se měly využívat všechny dostupné metody, které mohou poskytnout relevantní data, na jejichž základě mohou být přijata preventivní a intervenční opatření. Vzhledem k širokému záběru této problematiky vyvstává naléhavá potřeba užšího propojení a zapojení mnoha biomedicínských oborů do preventivní medicíny. Tato disertační práce přináší data z využití nově zavedených metod pro rychlou predikci a identifikaci potenciálu ED (se zaměřením na steroidní signalizaci) u chemických látek a z optimalizace těchto metod pro širší využití k identifikaci potenciálu ED u spotřebních výrobků. Dále poskytuje experimentální data o výskytu některých ED v moči běžné populace a data z doplňkové studie na omezeném souboru dobrovolníků, zaměřené na možná intervenční opatření pro snížení expozice ED. Na základě experimentálních výsledků a důkladné rešerše více než 200 odborných literárních zdrojů byl připraven informační materiál obsahující doporučení jak potenciálně preventivně snižovat expozici ED, vhodný pro preventivní poradenství v klinické praxi s cílem oslovit jak odbornou veřejnost, tak citlivé skupiny populace.

2.1. Summary

Substances of natural or synthetic origin, capable of activating or inhibiting the functions of cellular receptors and thus contributing to the modulation of the neuroendocrine system through the pathways of hormonal signaling ("disrupting" the endocrine system) are referred to in the literature as "endocrine disruptors" (ED). Endocrine disruption as a form of mild systemic toxicity of chemicals and their mixtures is intensively addressed at both scientific and legislative levels. In 2018, progress has been made towards the introduction of a comprehensive European Union legislative framework for ED when a consensus was reached on the scientific criteria for their assessment and identification. ED research is supported by the European Union as a significant task of preventive medicine. Under the various Framework Programs for Research and Innovation, the EU has provided funding to dozens of projects and has supported projects under Horizon 2020 to develop appropriate methods for testing ED. The legislation on e.g. pesticides and biocides, chemicals (REACH), medical devices, cosmetics, food contact materials, water, toys, and workplace protection has been updated. Due to legislative developments, new intervention or preventive measures aimed at consumer protection can be expected, especially for substances which may be used or are present in consumer products or enter the food chain. *In vitro* toxicological methods for early identification of ED potential have been used predominantly to obtain data on the toxicity of chemicals, but may have potential for wider use in preventive medicine, e.g. in identifying ED sources, testing mixtures (or extracts from consumer products), biological samples for prevention and monitoring of ED exposure, in obtaining mechanistic data demonstrating potency of samples at specific concentrations, as compared to substances with known pharmacokinetic parameters. The general population is exposed to mixtures of many substances at very low concentrations, coming from all environmental sectors, various industries, food and consumer products. There are still unanswered questions whether the individual activity of particular substances at a certain concentration or even the combined effects of multiple substances at low concentrations are responsible for the development of adverse effects. Human risk assessment approaches are still evolving, particularly in the context of realistic levels of ED exposure, bioavailability, metabolic (de) activation and elimination. The main trend in EU legislation and regulation is the precautionary principle, where human exposure to EDs should be preventively reduced. For this purpose, all available methods that can provide relevant data on the basis of which preventive and intervention measures can be taken should be used. Given the broad scope of this issue, there is an urgent need for closer links of many biomedical disciplines to preventive medicine.

This dissertation thesis brings data from the use of newly introduced methods for rapid prediction and identification of the potential of ED (with a focus on steroid signaling) of chemicals and from the optimization of the methods for wider use to identify ED potential in consumer products. In addition, it provides experimental data on the incidence of some EDs in the urine of the general population and data from an additional study in a limited set of volunteers focusing on possible intervention measures to reduce ED exposure. Based on experimental results and a thorough search of more than 200 research articles and literature sources, an informative material was prepared containing recommendations for potential preventive reduction of ED exposure, suitable for preventive counseling in clinical practice to address both the professional public and sensitive population groups.

3. Literární úvod a přehled dané problematiky

Nové poznatky ukazují, že sekrece hormonů a endokrinně aktivních látek není vázána pouze na žlázy s vnitřní sekrecí, ale že k syntéze dochází v řadě buněk, které jsou lokalizovány v mnoha tkáních, propojených v difúzní systém. Nervová soustava, rychle reagující na okamžité změny vnějšího i vnitřního prostředí a žlázy s vnitřní sekrecí, zajišťující déletrvající reakce a dlouhodobější změny, jsou úzce propojeny a označovány jako neuroendokrinní systém, regulující funkce jednotlivých tkání a orgánů tak, aby jejich koordinovanou činností bylo docíleno homeostázy. V situacích, kdy je homeostáza ohrožena, může být do koordinační funkce zapojen i systém imunitní. Mezi endokrinně aktivní se v poslední době řadí i např. tuková tkáň, ve které se mohou kontaminující látky kumulovat (Müllerová et al. 2007), nervová tkáň, kůže, která efektivně absorbuje a metabolizuje např. bisfenol A (Zalko et al. 2011) a vlasové folikuly (Nikolakis et al. 2016), aktivované buňky imunitního systému nebo buňky trávicí soustavy. Tradiční endokrinologie, přesně definující patofyziologii endokrinních onemocnění, se mění v systémový obor širšího zaměření a prorůstá do dalších oborů (bio)medicíny a preventivní medicíny (Zamrazil 2010., 2010, Frye et al. 2012, Fontana et al. 2015). Oblast endokrinní disrupce (ED), tj. narušování endokrinní signalizace, se v poslední době stala jedním z předních vědeckých témat, vyznačujících se komplexností a nesnadným zpracováním zejména z hlediska preventivní medicíny a toxikologie. Všudypřítomná kontinuální expozice mnoha látkám v nízkých koncentracích, různorodost interakcí, souběžné působení v organismu, jakož i individuální variabilita homeostatických mechanismů, genetická variabilita populací, regionální a etnické rozdíly v prostředí, stravovacích návycích a životním stylu komplikují spolehlivou průkaznost rizika konkrétních látek pro člověka, zejména pokud se účinky mohou projevit s časovým odstupem nebo až v dalších generacích (Bernal & Jirtle 2010, Greally & Jacobs 2013, Meeker 2012, Skinner 2014, Prusinski et al. 2016, Kundakovic et al. 2013). Paradoxně i rychlý vývoj nových technologií a intenzivní průmyslová výroba, díky které je do prostředí rychle uváděno mnoho nově vyprodukovaných látek, materiálů a výrobků, přispívá ke zvýšené expozici, neboť legislativní a regulační systémy nejsou schopny stejně rychle reagovat na aktuální situaci pomocí preventivních a intervenčních opatření.

S ohledem na množství látek a na řadu jejich možných interakcí v organismu, širokou dostupnost spotřebních výrobků různé kvality, jež mohou obsahovat látky s dosud neidentifikovanou endokrinní aktivitou (buď jako dosud povolené složky či vyskytující se jako nežádoucí kontaminanty), zesiluje tlak na identifikaci a následnou regulaci potenciálních ED. Mechanistická data z *in vitro* studií prokazují, že jednotlivé chemické látky obvykle vyvolávají buněčnou odpověď v koncentracích o několik řádů vyšších než u přirozených hormonů. Souběžné působení mnoha přirozených i exogenních látek a jejich metabolitů, nacházejících se v organismu v nízkých koncentracích, je však čím dál více zdůrazňováno jako relevantní rizikový faktor, potenciálně přispívající k rozvoji patofyziologických stavů. Identifikace nebezpečnosti směsí o neznámém složení, případně směsí složených z látek ve velmi nízkých, individuálně inaktivních koncentracích je proto doporučována jako nutná, pro odhalení kombinovaných účinků látek přítomných ve směsích (SCHER, SCCS, SCENIHR 2012, Hoffmann et al. 2017, Schug et al. 2011, Prusinski et al. 2016, Skinner MK 2014, Kato et al. 2006, Sifakis et al. 2017, Silva et al. 2002, Vandenberg et al. 2012, Rajapakse et al. 2002, Pang et al. 2018, Thongon et al. 2017, Patisaul HB 2017, Rodgers et al. 2018).

Endokrinní disrupce se stává širokým tématem zasahujícím do mnoha biomedicínských disciplín, a to zejména preventivní medicíny, toxikologie, neinfekční epidemiologie a farmakologie. V rámci preventivní medicíny je kromě preventivního poradenství a preventivních intervenčních opatření s cílem chránit zdraví spotřebitele klíčovou aktivitou přenos výsledků výzkumu endokrinní disrupce do klinické praxe a následný osvědčený přístup erudovaných praktických lékařů, odborně způsobilých poskytovat preventivní poradenství. Na základě vědecky podložených informací z výzkumu o možných projevech ED je možno posoudit např. pracovní a životní prostředí, stravovací návyky a životní styl a vzít v úvahu možný vliv expozice ED na rozvoj patofyziologií zejména u citlivých populací (za které jsou považovány zejména těhotné ženy a děti v obdobích vývoje). Vzhledem k možným klinickým interakcím potentních ED s některými enzymy (např. CYP450) a proteiny (např. ABC transportéry) (Němcová - Fürstová et al. 2016) zapojenými do farmakokinetiky léčiv lze v případě neuspokojivé odpovědi na léčbu (po vyloučení faktorů jako např. nízká compliance) uvažovat zvýšenou expozici potentních ED a možné interakce ED s cílenou léčbou (Slíva & Patočková 2007, Wuttke et al. 2003, Vineis & Kriebel 2006, Pang et al. 2018, Hlaváč et al. 2014,). Ve snaze maximalizovat prospěch z léčby i preventivních nefarmakologických postupů (např. režimových opatření) u vybraných onemocnění se ED stala aktuálním tématem preventivní medicíny. Výsledky výzkumu z oblasti endokrinní disrupce mohou podpořit prevenci výskytu patofyziologií a v celkovém výsledku přispět ke zvýšení efektivity využívání zdrojů ve zdravotnictví. Úplná eliminace ED z životního prostředí není reálná, proto je v rámci preventivní medicíny smysluplná vědecky podložená a erudovaná osvěta poskytovaná odbornou veřejností s cílem oslovit nejvíce ohrožené a citlivé skupiny populace, zejména o preventivních úpravách životního stylu, které mohou pravděpodobnost expozice ED potenciálně snižovat.

3.1. Signalizace a syntéza steroidních hormonů

Neuroendokrinní regulace syntézy steroidních hormonů je zajištěna signálním systémem, zahrnujícím hypothalamus, hypofýzu a gonády (osa HPG). Steroidní hormony jsou lipofilní a jejich společným prekurzorem je cholesterol. Výchozí molekuly pro syntézu steroidních hormonů jsou přítomny ve všech příslušných místech produkce, kterými jsou primárně Leydigovy buňky varlat a nadledviny pro testosteron, pro estrogény u ženy folikulární buňky vaječnicků, žluté tělísko a placenta. V menší míře jsou do steroidogeneze zapojeny i další tkáně, např. přibývá poznatků o vlivu ED na procesy v kůži a tukové tkáni, ve kterých byla zjištěna přítomnost steroidogenních enzymů (Ceruti et al. 2018, Slominski et al. 2013, Gérard & Brown 2018, Waraich RS & Mauvais-Jarvis F 2013, Nikolakis et al. 2016). Syntéza je zpětnovazebně regulována pomocí receptorové signalizace pro nadřazené signalizační hormony i pro výsledné produkty (estrogenové, androgenové receptory a jim příslušné hormony) a závisí též např. na aktivitě enzymů (např. 5 - alfa - reduktáza, aromatáza). V krvi jsou steroidní hormony přítomné převážně ve vazbě na transportní proteiny (např. steroidy vázající protein SHBG). Syntéza transportních proteinů je opět zpětnovazebně regulována (např. hladinu SHBG zvyšují estrogény a snižuje testosteron). Fyziologický účinek navozuje cirkulující biologicky aktivní volná frakce steroidních hormonů (méně než 10 % celkového syntetizovaného množství), pronikající do buněk v cílové tkáni. Odbourávání steroidních hormonů a jim podobných látek probíhá primárně v játrech, kde jsou konjugovány svými OH-skupinami na sulfáty nebo kyselinu glukuronovou a jako konjugáty jsou v rámci hodin vyloučeny

žlučí nebo močí (Rokyta a kol. 2015, Kittnar et al. 2011, Silbernagl & Despopoulos 2004, Fontana et al. 2015, Slíva J 2010). ED mohou ovlivňovat steroidní signalizaci na stejných úrovních, na kterých působí molekuly, jejichž funkce jsou ED schopny s různou potencí mimikovat - např. na úrovni saturace a (in)aktivace receptorů (kdy množství navázaného ligandu je úměrné počtu receptorů, koncentraci ligandu a afinitě ligandu k receptoru), dostupnosti enzymových substrátů, (in)aktivace enzymů, sekrece konečných produktů, cirkulace signálních molekul, saturace transportních proteinů. V důsledku může docházet např. k ovlivnění množství buněčných receptorů a množství produkující cílové tkáně obsahující endokrinně aktivní responzivní buňky. Kromě narušení signalizace skrze jaderné receptory může docházet k narušení i skrze receptory lokalizované v buněčné membráně, na úrovni např. tvorby druhých posílů (např. cAMP), hladiny intracelulárních iontů Ca^{2+} , vodivosti kanálu, fosforylace proteinů. Dostupnost *in vitro* funkčních testů dokumentovala mechanismus tzv. signalizačního bias - „biased signalizace“, tj. že agonisté pro receptory, které pleiotropně anebo i nepřímo ovlivňují více signálních drah v buňce, mohou mnohé buněčné signály zkříženě významně ovlivňovat. Takové výsledky, kromě terapeutického potenciálu, dokládají i to, že (neuro)endokrinně aktivní látky mohou přispívat k bias laboratorních výsledků, tj. k narušování jejich pravdivosti, která je klíčovým tématem laboratorní medicíny jako jednoho z preventivních oborů podílejícího se na včasné diagnostice (Melmed S 2016, Kenakin T 2017, Friedecký B 2009).

3.2. Receptory - cíl endokrinních disruptorů

Díky výzkumu molekulární biologie a proteomiky byla řada receptorů již identifikována, izolována, a biochemicky charakterizována. Některé zdroje uvádějí, že je známo více než 50 základních typů receptorů. Geny pro receptory byly sekvenovány a klonovány, proto jsou známy jejich sekvence, včetně některých typů mutací, zodpovědných např. za receptorová nebo onkologická onemocnění. Úroveň poznání interagujících, regulujících i regulovaných systémů a jejich genů je díky neustále přibývajícím novým poznatkům zpřesňováno, např. ve smyslu, jak receptory determinují kvantitativní vztah mezi dávkou léčiva a farmakologickým účinkem i jak jsou zodpovědné za selektivitu účinku. Mnoho informací ohledně regulací a buněčné signalizace lze zjistit z veřejně přístupných databází zaměřených na mapování metabolických a signalizačních drah, např. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>) (Goto et al. 2002). Databáze obsahují rozsáhlé datové sady generované sekvenováním lidského genomu a pokročilými experimentálními technologiemi. KEGG je databázový zdroj pro porozumění funkcím biologického systému, které vycházejí z regulací na molekulární úrovni. V této práci bylo vycházeno z dat uvedených v databázi KEGG jak pro obecnější popis mechanismů, tak se zaměřením na receptorovou signalizaci skrze jaderné receptory pro steroidní hormony (estrogeny a androgeny).

Zatímco mezi enzymy či regulačními proteiny nejsou významné rozdíly ve struktuře, struktura receptorů je složitá. Podle požadavků na rychlost reakce buňky syntetizují konkrétní typ receptorů (jaderné receptory regulující transkripci, membránové receptory ionotropní spřažené s iontovým kanálem, membránové receptory metabotropní spřažené s G-proteinem či s enzymem, přímo či nepřímo působící membránové receptory). Odpověď na aktivaci receptoru trvá od milisekund po hodiny dle typu receptoru (Bultas 2014). Jaderné receptory fungují jako ligandem regulované transkripční faktory a mají klíčovou roli ve vývoji a udržování homeostázy,

reprodukčních a metabolických pochodech (Laudet & Gronemeyer 2002). Proto jsou jaderné receptory považovány za důležité terapeutické cíle. Jaderné receptory mají modulární strukturu a obsahují funkční domény, např. N-terminální doménu (obvykle s transaktivační funkcí přenášející signál na iniciační místo transkripce), doménu vázající DNA (vykazující vyšší homologii díky konzervovaným sekvencím) a doménu vázající ligandy, jejíž struktura se liší např. v hydrofobních aktivačních funkčních místech (AF site), u kterých jsou aminokyselinové sekvence silně konzervovány pro jednotlivé konkrétní receptory (Axerio-Cilies et al. 2011). Řada jaderných receptorů se vyskytuje v (dosud zjištěných) několika subtypech, dělících se na další isoformy, které jsou specifické pro konkrétní buněčnou populaci nebo tkáň. Jako nejčastější cíle ED jsou zmiňovány např. estrogenový, androgenový, glukokortikoidový, mineralokortikoidový, retinoidový, progesteronový, aryl-hydrokarbonový receptor a receptory thyreoidních hormonů. (Rana et al. 2012, Goto et al. 2002, Balaguer et al. 2017).

Jako potenciální receptorové ligandy mohou ED interagovat s více typy receptorů s proměnlivou afinitou a různým stupněm aktivace (Balaguer et al. 2017). Při interakci ligandu s receptorem (případně enzymem, iontovým kanálem, apod.) je důležitá jak afinita, tak povaha vazby na cílovou strukturu. Afinita je dána silou vazby – při vysoké afinitě obsadí ligand při stejné koncentraci větší počet receptorů než při afinitě nízké a tato vazba má delší disociační poločas.

Vazbou ligandu na receptorový protein se mění jeho konformace, určující jeho biologickou funkci. Vazba může být vratná (reverzibilní) či nevratná (ireverzibilní), při které je receptor vyřazen z funkce. Délka efektu, kterého ligand dosáhne, závisí na schopnosti a rychlosti tkáň nefunkční receptory nahradit nově syntetizovanými. Většina tkání je schopna efektivní náhrady syntézou nových receptorů, nicméně např. bezjaderné erythrocyty nebo trombocyty postrádají DNA k přepisu informace, proto proteiny těchto buněk po vyřazení z funkce zůstávají nefunkční po celou dobu své cirkulace (Bultas 2014). Nejčastěji dochází k reverzibilním vazbám mezi receptory a jejich ligandy pomocí „slabých“ molekulových interakcí (iontových nebo vodíkových vazeb či Van der Waalsových sil), které jsou fyziologicky regulovány. Fyziologické účinky mohou být ovlivněny absorpcí, metabolismem, dispozicí tkáň a poločasem eliminace komplexu receptor-ligand. Některé molekuly mohou působit tak, že svou vazbou na jiné než ligand vázající místo ovlivní poločas eliminace komplexu receptor-ligand, případně ovlivní vazbu koaktivátorových proteinů, a tím je také ovlivněna aktivace receptoru přirozeným nebo silným ligandem. Přirozené estrogény nebo androgény se vážou na příslušné receptory s vysokou afinitou (např. s disociačními konstantami (Kd) mezi 10 pM a 1 nM). Syntetické látky se v závislosti na molekulové hmotnosti, struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech obvykle vážou na receptory s afinitami o několik řádů nižšími, např. bisfenoly, ftaláty až od 10 nM (Balaguer et al. 2017, Farman & Rafestin - Oblin 2001).

Hydrofobní molekuly se stejně jako lipofilní steroidní hormony po prostupu cytoplazmatickou membránou mohou vázat na jaderné receptory přítomné v cytosolu specifických buněk. Pro hydrofilní molekuly je cytoplazmatická membrána nepropustná, mohou se však účastnit signalizace přes membránové receptory a signál je pak transportován do buňky skrze „druhé posly“ (cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), guanosinmonofosfát (cGMP), inositol-1,4,5-trifosfát (IP3), vápenaté ionty Ca²⁺ nebo specifické proteinkinázy). Hydrofilní molekuly difundují v buňce, mohou reagovat s dalšími signálními molekulami, ovlivňovat fosforylaci proteinů a účastnit se sérií kaskádových biochemických reakcí směřujících k vyvolání specifické buněčné odpovědi, kterou je obvykle indukce/represe transkripce genů a syntéza konečných produktů (proteinů, enzymů, receptorů, atd.) (Yang & Hinner 2015).

Receptorová signalizace je přísně zpětnovazebně regulována skrze vzájemně interagující molekuly, koaktivační a korepresorové proteiny. Jde o součást komplexních systémů organismu, kde přirozeně dochází ke křížení signálních drah a uplatňuje se vliv vnitřních i vnějších faktorů - např. cirkadiálních rytmů a spánkového režimu, fyzické a psychické zátěže, úrovně stresu, kvality výživy, pohybové aktivity, stavu metabolismu i aktuální zdravotní (in)dispozice) (Slíva J 2010, Bookout et al. 2006, Allegretti et al. 2016, Balaguer et al. 2017, Vrtačnik et al. 2014, Kuiper et al. 1997, Wagner et al. 2001, Yang et al. 2006). Regulační kaskády receptorové signalizace jsou cíleně terapeuticky ovlivňovány za účelem léčby řady onemocnění, jejichž terapie směřuje ke kauzálnímu ovlivnění poruch na nejnižší úrovni, tj. jemných vztahů v rámci regulačních drah v buňce. Cestou ovlivnění regulace (aktivací či inhibicí) působí mnoho léčiv, a to různými mechanismy, např. skrze regulační receptory, metabolické systémy (zejména enzymy, eventuálně kofaktory), iontové či transportní kanály, regulační proteiny apod. Cílovou molekulou jsou obvykle proteiny jako součást receptoru, iontového kanálu či přímo enzymu. Přístupy preventivní medicíny na výzkumné biomedicínské úrovni jsou nepostradatelné např. pro identifikaci zdrojů ED a monitoring expozice, studium prediktivních či prognostických biomarkerů různých patofyziologických stavů a detekci vnějších i vnitřních faktorů s potenciálem receptorovou signalizací narušovat. Na úrovni klinické jsou nepostradatelné preventivní přístupy jako poradenství a intervenční doporučení zdůrazňující zdravý životní styl, snižování expozice kontaminantům z prostředí, důraz na kvalitní výživu a vhodné stravovací návyky, dostatek vhodného pohybu, omezování stresu, ale také důslednost při absolvování preventivních vyšetření, zavedených v rámci zdravotního systému za účelem prevence závažných onemocnění.

3.2.1. Receptorové interakce

Většina ED má relativní selektivitu chemické vazby, proto odpověď ve vztahu receptor – ligand může mít různý charakter. ED mohou svou vazbou receptor úplně, částečně i současně aktivovat / inhibovat nebo posilovat či zeslabovat vazbu (odpověď) přirozeného (silného) ligandu. Tyto složité receptorové interakce a vzájemné působení látek (agonistů a antagonistů) mají významný klinický přesah (např. z hlediska využití konkrétního typu léčiva, posouzení interakcí látek, ale také při identifikaci toxicity ED). *Agonista* se váže na receptor a aktivuje ho, *antagonista* blokuje vazebné místo receptoru, tím brání vazbě agonistů na receptor a jeho aktivaci. *Úplný agonista (resp. plnohodnotný, silný)* má vysokou účinnost, efektivně stimuluje buněčnou odpověď skrze vazbu na relativně malý podíl receptorů a zvyšuje poměr aktivovaných receptorů vůči inaktivním. Určité množství receptorů může být v bazálním aktivním stavu i bez přítomnosti agonistů, tyto receptory pak mohou být ovlivněny antagonisty, kteří jejich bazální aktivitu mohou inhibovat. *Parciální (částečný) agonista* má nižší účinnost - vyvolá pouze částečnou odpověď i v saturované koncentraci, kdy obsadí maximální počet volných receptorů (tj. zvýšení koncentrace tohoto ligandu nevyvolá vyšší odezvu). *Kompetitivní antagonist* receptor neaktivuje, ale blokuje jeho aktivaci tím, že soutěží s agonisty o stejné vazebné místo. *Inverzní agonista* v případě vysoké spontánní aktivity receptoru vyvolá protichůdný účinek, tj. po vazbě na receptor vyvolá opačnou odpověď, než jakou by vyvolal plný agonista. *Smíšený agonista/antagonista* působí stimulačně na jeden typ receptoru, na druhý typ naopak inhibičně. *Vícenásobný agonista / antagonist* interaguje s více typy receptorů. Ligandy lze dále popisovat podle toho, do které části receptoru se vážou a jakou sílu má jejich chemická vazba. *Kompetitivní ligandy* se vážou na specifické vazebné místo na

ligand vázající doméně. *Nekompetitivní alosterické ligandy* jsou schopny vytvořit vazbu na jiných místech receptoru a mohou např. stérickou zábranou ovlivnit vazbu agonistů či koaktivátorových proteinů a bránit aktivaci receptoru. *Nespecifické ligandy* se mohou kromě receptorů vázat na různé typy proteinů účastnících se buněčné odpovědi. *Reverzibilní agonisté* nebo *antagonisté* snadno a rychle disociují z receptorového komplexu a mají krátký disociační poločas. *Ireverzibilní agonisté* nebo *antagonisté* tvoří s receptory stabilnější chemické vazby (např. alkylací), mohou tak potenciálně snižovat počet receptorů volných pro vazbu silného agonisty. *Pseudo-ireverzibilní antagonisté* pomaleji disociují. Na receptor se může vázat více molekul současně, např. při *nekompetitivním antagonismu*, kdy může být více ligandů součástí receptorového komplexu, avšak vazba antagonistů v nespecifických místech komplexu snižuje nebo znemožňuje aktivaci receptoru agonistou. Při *reverzibilním kompetitivním antagonismu* agonisté a antagonisté paralelně vytvářejí krátkodobé vazby s receptorovým komplexem a mohou dosáhnout i ustáleného stavu, který může být přerušen zvýšením koncentrace silného agonisty (Brzozowski et al. 1997). Na úrovni organismu některé látky mohou působit agonisticky v jednom typu tkáně a antagonisticky v typu jiném, neboť exprese genů pro jednotlivé subtypy receptorů je tkáňově specifická (Kuiper et al. 1997, Rider et al. 2010, Vrtačnik et al. 2014, Schug et al. 2011, Luccio-Camelo & Prins 2011, Molina-Molina et al. 2013). Výsledný účinek ligandu je ovlivňován nejen afinitou k cílové struktuře (receptoru, enzymu), ale také okolnostmi nezávislými na vlastnostech ligandu nebo receptorovém proteinu, např. hustotou osazení buněčné membrány receptory nebo úrovní syntézy jaderných receptorů, nacházejících se v cytosolu. Fyziologická syntéza receptorů je časově proměnlivá, zpětnovazebně regulovaná a závisí mimo jiné i na přítomnosti ligandů, z nichž některé syntézu receptorů zvyšují, jiné naopak snižují. Obdobné vztahy existují ve variabilní nabídce enzymů, nejen na podkladě genetickém, ale i vlivem mnoha vnějších faktorů.

Celá řada interakcí komplikuje především identifikaci individuální aktivity látek přítomných ve směsích (např. extraktech, biologických vzorcích, atd.), jelikož v celkovém výsledku např. studií *in vivo* mohou být zahrnuty mnohé variabilní reakce. Pleiotropní vlastnosti řady látek byly doloženy studii zaměřenými na různé typy receptorů – estrogenový, androgenový, progesteronový, receptory pro thyroidní hormony, retinoidový, glukokortikoidový, aryl hydrokarbonový, s G-proteiny spřažený estrogenový receptor, atd. (Zhao et al. 2013, Zoeller et al. 2005, Prasanth et al. 2010, Boucher et al. 2016, Manolagas et al. 2013, Molina-Molina et al. 2013, Roelofs et al. 2015, Luccio-Camelo & Prins 2011). Odhalování toxikologických vlastností směsí a stanovování rizika pro člověka je proto velmi aktuální výzvou v toxikologii a v preventivní medicíně (SCHER, SCCS, SCENIHR 2012, Ezechiáš & Cajthaml 2018, Vandenberg et al. 2012, Allegretti et al. 2016, Hernández et al. 2017, Bruning et al. 2016, Marty et al. 2011, Salahudeen & Nishtala 2017, Orton et al. 2014, Kortenkamp 2009, Rodgers et al. 2018, Dahl & Akerud. 2013).

Důsledkem nežádoucích interakcí ED, napodobujících aktivitu ligandů na úrovni receptorové signalizace mohou nastat změny počtu receptorů nebo změny jejich citlivosti k ligandům, a to ve smyslu snížení citlivosti (desenzibilizace), nebo zvýšení citlivosti (hypersenzibilizace), podobně jako u neuroreceptorů, které podléhají ligandem indukované desenzibilizaci, kdy po dlouhodobém vystavení neurotransmiterům na jejich koncentrace dlouhodobě nereagují. Desenzibilizace receptorů je dána snížením jejich citlivosti po opakovaném nebo dlouhodobém působení agonistů a zahrnuje např. snížení aktivity komplexu ligand-receptor nebo receptor-efektor, snížení počtu receptorů nebo afinity přirozených ligandů k vazebným místům receptorů. Se snížením citlivosti receptorů souvisí rozvoj tolerance, tj. stavu, u něhož je vyžadována

stále vyšší dávka ligandu (hormonu, léčiva) pro dosažení žádoucího účinku. Hypersensibilizace receptorů, tj. opačný stav desenzibilizace, je navozena dlouhodobým vyřazením receptoru určitého typu z funkce, přičemž příčinou může být dlouhodobá přítomnost jeho antagonistů. Znáмым příkladem rozvoje tolerance je např. kofein. Kofein jako neselektivní antagonist adenozinových receptorů prokazatelně svými alosterickými interakcemi krátkodobě zvyšuje duševní činnost a bdělost. Počet adenozinových receptorů se ale při užívání kofeinu zvyšuje a k blokování jejich vazebných míst pro adenozin je vyžadována stále vyšší dávka kofeinu. Po vysazení kofeinu se silně projeví účinky adenozinu, např. ospalost. Kofein lze použít i jako příklad pleiotropních účinků, neboť je inhibítozem fosfodiesterázy (enzymu katalyzujícího hydrolýzu cAMP), což vede ke zvýšení koncentrace cAMP v buňce a tím k nepřímému ovlivnění regulace metabolismu glykogenu, cukrů a lipidů prostřednictvím cAMP-dependentních proteinových kináz; dále má vliv např. na mobilizaci intracelulárního vápníku ze sarkoplazmatického retikula svalových buněk a interaguje s receptory pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABAA) v nervové tkáni.

3.2.2. Estrogenové receptory

Estrogenové receptory (ER) jsou obecně popisovány jako jaderné receptory aktivované v cytosolu estrogenními agonisty (estradiol, estriol, estron atd.), které fungují jako transkripční faktory. ER jsou syntetizovány u žen hlavně v prsní žláze, děloze, endometriu a vejcovodech, u obou pohlaví v buňkách hladkého svalstva. Exprese genů pro ER byla identifikována v nižší míře i v dalších tkáních a buněčných typech u obou pohlaví, jak lze zjistit např. z výstupů projektu „The Human Protein Atlas“ (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000091831-ESR1/tissue>). ER tak mohou být zapojeny do mnoha fyziologických dějů reprodukce a vývoje, signalizace v kardiovaskulárním a centrálním nervovém systému, metabolismu, udržování homeostázy vody a iontů, remodelaci kostí, imunomodulačních procesech atd. U lidí byla zjištěna přítomnost dvou základních subtypů ER α , ER β s dalšími číselně označenými isoformami. Byly rovněž identifikovány receptory ERR (estrogen related receptors) s isoformami α , β , γ , schopnými vázat fytoestrogeny nebo syntetické látky, ale teprve nedávno pro ně byly četné ligandy důkladněji identifikovány (proto byly dosud označovány jako sirotčí – „orphan“ jaderné receptory) (Lynch et al. 2018). Nedávno byla popsána lokalizace ER i v buněčné membráně a možnosti jejich translokace do cytosolu. Dále byl identifikován estrogenový receptor GPER-1, vázaný na membránu endoplazmatického retikula, spřažený s G- proteiny, jehož ligandem je estradiol. Tyto nové poznatky rozšiřují klasický koncept estrogenové jaderné signalizace a mohou přispět k hlubšímu porozumění fyziologických účinků estrogenů a vlivu estrogenové signalizace např. na diferenciaci pluripotentních buněk nebo rozvoj hormonálně responzivních onemocnění u žen i mužů (Molina et al. 2017, Bonkhoff H 2018, Saczko et al. 2017, Almey et al. 2015, Marczell et al. 2018, Prabhushankar et al. 2014, Festuccia et al. 2018, Lynch et al. 2018, Fietz et al. 2014, Gangkak et al. 2017).

Přirozené i syntetické ligandy se liší svou afinitou k alfa a beta izoformám ER - např. estradiol se váže srovnatelně na obě izoformy, estron se váže přednostně na alfa receptor, estriol na receptor beta. Různé kombinace ER tak mohou reagovat na ligandy odlišně a jejich tkáňová distribuce je pak určující pro tkáňovou odpověď. Koncepce selektivních modulátorů ER, využívaná k léčbě hormonálně responzivních onemocnění, je založena na schopnosti podporovat interakce ER s různými proteiny typu koaktivátorů nebo korepresorů, přičemž poměr koaktivátoru

ke korepresorovému proteinu je opět tkáňově specifický. V důsledku toho může být stejný ligand agonistou ve tkáni, kde převažují koaktivátory, a antagonistou v jiném typu tkáně, kde dominují korepresory. Například tamoxifen, selektivní modulátor ER, funguje jako antagonist ER v prsní tkáni, jako agonista v kostech a částečný agonista v endometriu. Díky jeho využití jako referenčního materiálu v antagonistických studiích pro sledování endokrinní disrupce ER mohou přibývat data o látkách, které vykazují podobnou potenci jako např. toto léčivo.

Ovariální steroidní signalizace skrze jaderné a membránové estrogenové receptory je znázorněna na obr. 1. Ze schématu vyplývá, že tato signalizace zahrnuje signální dráhy významné pro regulaci buněčného cyklu (MAPK, PI3K-Akt) a signalizaci skrze ionty vápníku. Databáze KEGG na dalších signálních mapách přehledně popisuje i další signální mechanismy, zprostředkované estrogény, např. regulaci aktinového cytoskeletu, diferenciaci osteoklastů, absorpci minerálních látek, atd. Pro některé patofyziologie a onemocnění (např. předčasné ovariální selhání, osteoporózu, syndrom estrogenové rezistence, karcinom endometria a prsu) jsou zde popsány fyziologické molekulární mechanismy i konkrétní geny, u kterých dochází k nadměrné expresi nebo u nichž byly identifikovány mutace.

V genech pro ER byly zjištěny polymorfismy, jejichž výskyt je spojován s různými patologickými stavy a onemocněními (Pinkas et al. 2016). Genetické varianty mohou mít diagnostický, prognostický a prediktivní potenciál v preventivní medicíně, jsou-li identifikovány jejich kauzální vztahy s konkrétními patologiemi (Maney DL 2017, Soucek et al. 2006, Vymetalková et al. 2015, Kunická et al. 2014). Obvykle tyto polymorfismy mění citlivost na endogenní i exogenní ligandy, jež se v důsledku může klinicky projevit jako hyper- či hypostimulace. Do těchto molekulárních mechanismů mohou vstupovat všechny látky, které mají potenciál fungovat jako ED. Problematika disrupce ER se díky dlouhodobému výzkumu rozšiřuje do více oblastí preventivní medicíny, např. o potenciál ED ovlivňovat skrze buněčnou signalizaci transkripci různých genů, působit na endokrinní systém s ohledem na individuální variabilitu a vnímavost, interagovat s různými typy polymorfních nebo mutovaných proteinů a interagovat i s léčivy, což zdůrazňuje nutnost preventivní kontroly potenciální expozice potentním ED zejména u citlivých populací (Casanova-Nakayama et al. 2018, Kim et al. 2014, Vrtačnik et al. 2014, Revankar et al. 2005, Slíva J., 2010, Bondesson et al. 2015, Kuiper et al. 1997, Kuiper et al. 1998). Sledování komplexních interakcí, kterých se mohou ED účastnit, vyžaduje propojení více oborů preventivní medicíny do multioborového vědeckého přístupu, vycházejícího z (bio)medicínského výzkumu a pokročilých metod analytické chemie a vedoucího k preventivnímu poradenství a využívání preventivních screeningových programů pro zachycení časných stádií onemocnění, s jejichž výskytem je expozice ED spojována.

3.2.3. Androgenový receptor

Androgenový receptor (AR) je přítomen v mnoha tkáních lidského těla u obou pohlaví, jak lze zjistit z integrovaných databází, např. z projektu „The Human Protein Atlas“ (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169083-AR/tissue>). Základním typem je jaderný receptor aktivovaný v cytosolu vazbou androgenních agonistů (nejsilnějším ligandem je dihydrotestosteron, dále testosteron, androstendion, androstenediol, dehydroepiandrosteron, androsteron). AR je receptorem reagujícím s DNA skrze zinkové prsty (proteinovou strukturu, v níž se nachází vazebné místo pro zinek navázaný na cysteinový a histidinový zbytek), což poukazuje na potenciál např. i některých kovů schopných vázat se na aminokyseliny a SH-skupiny proteinů či enzymů (např. kadmia (Richter et al. 2017) a působit jako ED vůči tomuto typu receptorů. AR má stejně jako jiné jaderné receptory modulární strukturu a skládá se z různě homologních funkčních domén. Díky homologním strukturám mohou receptory v některých případech sdílet společné ligandy, které pak vykazují kombinované účinky na více receptorů zároveň (např. progestogeny mohou ve vyšších dávkách AR blokovat) (Raudrant & Rabe, 2003).

Jako příklad homologní konzervované struktury je možné uvést DNA vázající doménu, u které existuje až 80% homologie např. mezi androgenovými a glukokortikoidovými receptory. Typické pro DNA vazebnou doménu AR jsou tzv. zinkové prsty, tvořené dvěma peptidovými smyčkami, fixovanými čtyřmi cysteinovými zbytky s centrálním atomem zinku. Prostřednictvím těchto struktur se po navázání ligandu receptorový komplex váže na DNA v místech tzv. androgenových responzivních elementů (ARE) v promotorové oblasti regulovaných genů. Při regulaci transkripce spolupracují dvě molekuly receptoru, dimerizované prostřednictvím DNA vázající domény, které se vážou na ARE.

V genové sekvenci AR byly identifikovány polymorfismy v N-terminální transaktivační doméně zajišťující přenos signálu na iniciační místo transkripce (např. různý počet opakování trinukleotidových sekvencí CAG) a byly též popsány (původně dvě, později více) isoformy AR (Wilson & McPhaul, 1994, Belej & Kaplan 2007). V důsledku individuální variability N-terminální domény velmi dobře rozpoznávají protilátky při imunitní reakci. Výše uvedené molekulární charakteristiky mohou být jedním z příkladů, jak se problematika systémové toxicity ED rozšiřuje o možnost ED ovlivňovat i přidružené imunitní reakce, a že ED mohou být schopny interagovat jak s konzervovanými strukturami receptorů, tak s různými jejich isoformami. Toxicita ED může být ovlivněna individuální variabilitou v důsledku polymorfismů v genech pro receptory, které ovlivňují afinitu ligandů. (Heráček et al. 2005, Sakkiah et al. 2016, Belej & Kaplan 2007).

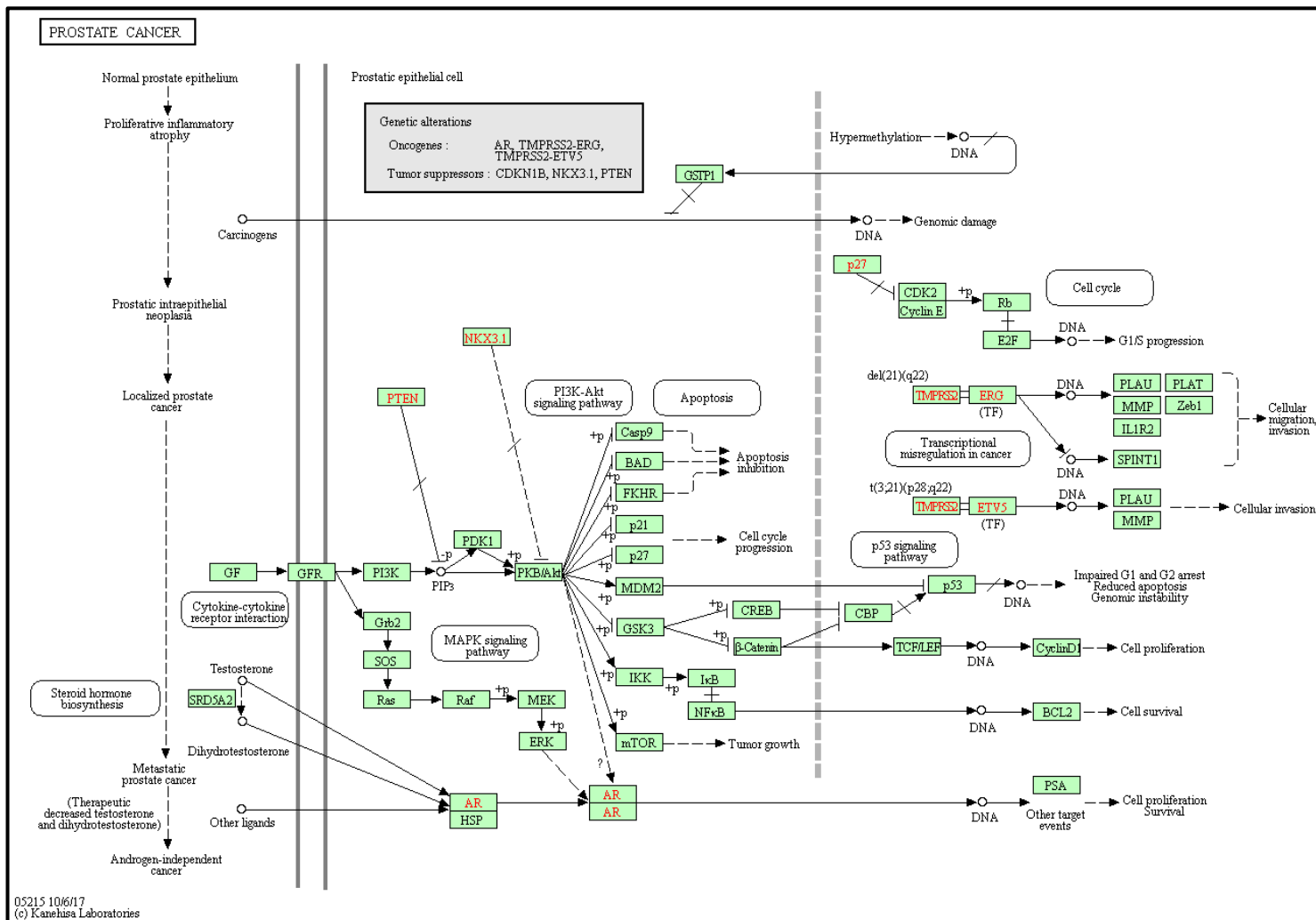
Podle nedávných výsledků AR vykazuje mechanismy regulace buněčné odpovědi i nezávisle na interakci s DNA, např. skrze cytoplazmatické proteiny účastníci se signální transdukce. Vazba androgenů na AR v cytoplazmě může způsobit rychlé změny nezávislé na změnách genové transkripce, např. změny iontového transportu. Regulace signálních transdukčních cest pomocí AR v cytoplazmě, před translokací do jádra, může nepřímou cestou vést ke změnám v genové transkripci, například skrze fosforylaci dalších transkripčních faktorů (Leung & Sadar, 2017). Nedávno byl popsán též membránový androgenový receptor ZIP9, široce distribuovaný v tkáních, fungující jako zinkem aktivovaný transportní protein spřažený s G-proteiny. Bylo popsáno jeho zapojení do androgenní signalizace jedinečnými mechanismy zahrnujícími několik signálních transdukčních cest a různé koregulátory (Pascal & Wang 2014, Thomas et al. 2018, Thomas et al. 2017).

Androgenové receptory sdílí syntetické ligandy s dalšími receptory, jejichž vazebná místa interakci umožňují. Při výzkumu molekulárních mechanismů souvisejících s rozvojem karcinomu prostaty bylo zjištěno, že např. bisfenol A je tzv. „antiandrogen N-terminální domény“, protože se váže na AR také skrze N-terminální doménu namísto ligand vázající domény, přes kterou se váže většina antiandrogenních látek. Jak bylo zmíněno výše, v sekvenci AR, konkrétně v N-terminální doméně, exonu 1, byly identifikovány polymorfismy v repetitivních sekvencích. Tyto polymorfismy mohou ovlivňovat afinitu ligandů (tj. i bisfenolu A) na základě individuální variability (vnímavosti). Využití látek s podobným účinkem, tzv. „antiandrogenů nového typu“ (např. diglycidyl ether, ralaniten, ralaniten acetát) je v současné době předmětem výzkumu zaměřeného na léčbu karcinomu prostaty (Monaghan et al. 2016).

Stejně jako např. u ER byly identifikovány četné ligandy přírodního původu (fytoestrogeny), začínají být popisovány látky často rostlinného původu, které obvykle fungují jako inhibitory androgenních enzymů, jako antagonisté AR nebo mají pleiotropní účinek. Většina sloučenin odvozených z rostlin vykazuje slabou antiandrogenní aktivitu, např. inhibicí konverze testosteronu na účinnější dihydrotestosteron, podporou konverze androgenů na estrogenery nebo ovlivňováním hladin signálních molekul zapojených do produkce testosteronu v Sertoliho buňkách varlat (Kampa et al. 2017). Léčiva ze skupiny nesteroidních antiandrogenů (např. flutamid) jsou využívány jako referenční materiály v antagonistických studiích anti-androgenní aktivity. Ukazuje se, že některé chemické látky nebo extrakty ze spotřebních výrobků mohou mít potenci blížící se hormonům (agonistické) nebo léčivům (antagonistické) - např. některé pesticidy nebo látky ze skupiny bisfenolů (Orton et al. 2011, Orton et al. 2014, Luccio-Camelo & Prins 2011, Prasanth et al. 2010, Paris et al. 2002).

Androgenní signalizace je schématicky znázorněna na příkladu narušení molekulárních mechanismů vedoucích k malignímu zvratu v prostatické tkáni – viz obr. 2. Identifikace klíčových molekulárních změn v buňkách karcinomu prostaty zahrnuje detoxikační enzymy (GSTP1, glutathion-S-transferázy), signalizační cesty růstových faktorů regulujících proliferaci a přežití buněk (NKX3.1, PTEN a p27) a AR jako determinanty buněčného fenotypu. Nedostatečné hladiny PTEN a NKX3.1 vedou ke snížení hladiny p27, zvýšení buněčné proliferace a snížení apoptózy. AR je transkripční faktor, který je normálně aktivován androgenními ligandy. Při nepřítomnosti androgenů může být androgenní signalizace aktivována i jinými ligandy (other ligands), amplifikací (nadměrným přepisem) AR genu, mutacemi AR genu nebo změnou aktivity koaktivátorů AR. Rozsáhlý výzkum v posledních desetiletích identifikoval molekulární mechanismy a objasnil vztahy steroidní signalizace a její vliv na rozvoj hormonálně rezistentních onkologických onemocnění.

Molekulární regulační mechanismy v prostatické tkáni demonstrují, že k narušení buněčné signalizace může docházet na mnoha úrovních. Tyto mechanismy programově regulují expresi specifických genů, a pokud jsou narušeny, může dojít k ovlivnění exprese (zesílení nebo utlumení) takových genů, jejichž produkty v důsledku přispívají k rezistenci terapie a k progresi onemocnění. Nové přibývající poznatky o komplexních interakcích látek zdůrazňují nutnost propojení multioborových přístupů preventivní medicíny, mezi které již patří preventivní screeningové programy pro zachycení časných stádií karcinomu prsu a prostaty (např. stanovení antigenu PSA, vyšetření prsní tkáně, genetická vyšetření), s jejichž rozvojem je expozice ED spojována. Významným přínosem a rozšířením mnohostranného oboru preventivní medicíny je též biomedicínský výzkum, např. studium biomarkerů perspektivních pro prognózu či účinnost cílené terapie (Matějů et al. 2010).



Obr. 2. Steroidní signalizace skrze androgenový receptor v prostatě. ED mohou nahrazovat „Testosterone, Dihydrotestosterone“ ve steroidní signalizaci a tak ovlivňovat buněčnou proliferaci a přežívání. (KEGG database, 5/3/2019).

3.3. Významné zdroje endokrinních disruptorů

Reálná expozice z prostředí představuje styk organismu s komplexními směsmi, často o neznámém složení. Chemické látky, individuálně přítomné v tak nízkých koncentracích, že by samy o sobě nevyvolaly biologický účinek, mohou ve směsích interagovat s dalšími jejími složkami nebo kontaminanty. Směs pak může vykazovat celkovou aktivitu, vycházející z aditivních, synergických nebo potencujících interakcí látek ve směsi přítomných. Identifikace složek, které jsou za biologický účinek směsi zodpovědné, je značně obtížná (SCHER, SCCS, SCENIHR 2012, Kortenkamp et al. 2009, Rajapakse et al. 2002, Rodgers et al. 2018, Silva et al. 2002). Zjištění, že v životním prostředí, potravním řetězci i biologických vzorcích lidí i zvířat se nachází řada chemických látek (Mervish et al. 2014), poukazují na potřebu hloubkové analýzy jejich endokrinní aktivity. Kauzální vztah mezi identifikovanou látkou a biologickým účinkem a následně riziko pro člověka však není snadné hodnotit, zejména z environmentálních, individuálních, ale i např. regionálních či socioekonomických důvodů (Varshavsky et al. 2018 Lakind & Naiman 2011).

Výsledky z dostupné literatury naznačují, že nejvíce relevantní pro běžnou populaci je dietární expozice ED (Mervish et al. 2014), přičemž expozice dermální a respirační (za předpokladu vyloučení kouření a úmyslného užívání toxických látek) jsou považovány za faktory k dietární expozici přispívající. Kromě životního prostředí tak mohou být zdrojem ED např. spotřební výrobky, potraviny nebo doplňky stravy.

ED byly nejčastěji identifikovány ve výrobcích na bázi plastů nebo papíru, ve stavebních materiálech, ve spotřebních výrobcích, přípravcích domácí chemie a v kosmetických přípravcích. Mezi látky, u nichž byla zjištěna endokrinní aktivita, a které jsou přítomny ve spotřebních výrobcích nebo ve vnitřním prostředí budov, patří např. polychlorované bifenyly (např. aroclor, přítomný v barvách a plastech), bisfenoly (např. bisfenol A, přítomný např. v ochranných vrstvách konzerv, plastech, termopapíru, epoxidových pryskyřicích, polykarbonátu), ftaláty (přítomné např. ve výrobcích z polyvinylchloridu, výrobcích domácí chemie), zpomalovače hoření (přítomné např. v textilních látkách používaných jako potahy nábytku), fotoiniciátory (přítomné v barvivech), fungicidy, insekticidy, methylestery mastných kyselin, UV filtry, atd. (ECHA 2015, Hormann et al. 2014, Goldinger et al. 2015, Schlumpf et al. 2008; Dodson et al. 2012; Liao & Kannan 2014; Liao et al. 2012, Liao & Kannan 2013, Molina-Molina et al. 2013, Mráz et al. 2016, Jiménez-Díaz et al. 2013, Orton et al. 2014, Ozáez et al. 2016).

Potraviny a doplňky stravy mohou obsahovat endokrinně aktivní látky přírodního původu - např. fytoestrogeny (Pang et al. 2018, Kuiper et al. 1998), mykotoxiny rodů *Fusarium* a *Alternaria*, u kterých byly zjištěny estrogenní interakce (Vejdovszky et al. 2017) nebo syntetické chemické látky jako kontaminanty ze zemědělské či průmyslové činnosti. Byly popsány slabé (anti-androgenní) účinky i některých konzervantů a potravinových aditiv (Pop et al. 2016). Látky užívané v zemědělství na ochranu rostlin (např. karbamátové, organochlorinové, pyrethroidové, triazinové a další pesticidy) vykazují kromě karcinogenních vlastností i endokrinní aktivitu (Park et al. 2016, Brander et al. 2016, Pirard et al. 2018, Orton et al. 2011). Do potravin se mohou chemické látky dostávat i migrací z obalů (např. vnitřní ochranná vrstva konzerv obsahuje látky ze skupiny bisfenolů) (Tateoka 2015) nebo během výrobního procesu, skladování či dopravy (např. ftaláty). V rozsáhlé kanadské studii potravin byly zjištěny vysoké koncentrace bisfenolu A u konzervovaných potravin (desítky až stovky ng/g), a to u ryb, kukuřice, polévky, pečených bobů, hrachu, a masových konzerv. V nižších koncentracích byl bisfenol A detekován v některých

nekonzervovaných potravinách (sýrech, chlebu, obilovinách, produktech rychlého občerstvení) (Cao et al. 2011). Konzumace potravin s obsahem fytoaktivních látek, např. sóji, některých bylin a koření (Patisaul HB 2017, Bartoňková & Dvořák 2018, Pang et al. 2018) a doplňků stravy nebo produktů tradičního léčitelství může též přispívat k expozici ED. Genistein, daidzein (např. ze sóji či červeného jetele), floretin (např. z jablek), kyselina elaidová, kyselina ursolová (např. z jablečné slupky), epigalokatechin-3-galát (např. ze zeleného čaje), kaempferol (přítomný např. v jablkách, pórku, citrusech, hroznech, ginkgo biloba nebo třezalce) a naringin (např. z grapefruitů a pomerančů) vykazovaly různé stupně antiestrogenní aktivity (Pang et al. 2018). Interakce s androgenovým receptorem byly zjištěny u epigalokatechinů (Siddiqui et al. 2011), či u extraktu z houby reishi, zejména frakce obsahující triterpenoidy (Fujita et al. 2005). Paeoniflorin, glycyrrhizin a kyselina glycyrrhizová, sloučeniny extrahované např. z kořene pivoňky (*Paeonia lactiflora*) inhibovaly produkci testosteronu a zvýšily aktivitu aromatázy (Takeuchi et al. 1991). Glycyrrhizová kyselina, přítomná též např. v lékořici nebo žvýkacím tabáku, je látka blokující 11 β -hydroxysteroidní dehydrogenázu měnící v tkáních kortisol na kortison. Silnou blokadou této přeměny se uplatňuje působení vyšších koncentrací kortisolu na mineralokortikoidové receptory (pseudohyperaldosteronismus, projevující se hypokalémií, hypervolémií a zvýšeným krevním tlakem). Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-stilbene), fytoalexin obsažený v červených hroznech, ovlivňuje steroidní signalizaci a jsou zjišťovány jeho chemoprotektivní účinky (De Amicis et al. 2019). Diindolylmethan rostlinného původu fungoval jako silný antagonist androgenového receptoru v lidských buňkách karcinomu prostaty (Le et al. 2003). Steviol, glykosid přítomný v rostlině *Stevia rebaudiana*, využívaný jako přírodní sladidlo, snížil progestagenní odpověď, významně zvýšil produkci progesteronu a indukoval agonistickou odpověď u progesteronového receptoru CatSper (exprimovaného spermii) (Shannon et al. 2016). Diarylheptanoid, katechol izolovaný z kurkumy (*Curcuma comosa*) vykazoval estrogenní účinky v nízkých koncentracích a antiestrogenní účinky v koncentracích vysokých (Thongon et al. 2017). Konzumace ovoce a zeleniny je doporučována jako stravovací návyky podporující zdraví. Fytoaktivní látky, obsažené přirozeně v rostlinách, jsou propagovány pro své chemoprotektivní účinky. Při nadměrném přísunu těchto látek však může docházet až k inhibici některých enzymů (střevních, jaterních) a k interakcím s léčivými, jak bylo prokázáno např. u naringeninů (z grapefruitu a dalších citrusů) nebo hypericinů a hyperforinů (z třezalky), allicinů (z česneku), výtažků z třapatky (rod *Echinacea*), ginsenosidů (ze ženšenu), atd. (Slíva & Patočková 2007).

Dalším zdrojem ED je spotřeba výrobků, jejichž užívání je prokázáno jako škodlivé (např. cigaret, alkoholu nebo nelegálních toxických látek), případně nadměrné užívání volně prodejných léků ze skupiny analgetik, neboť látky v nich obsažené mohou taktéž fungovat jako ED. Kanabinoidy inhibovaly akumulaci cAMP a stimulovaly MAPK signalizační dráhu skrze kanabinoidové receptory (Grotenhermen F 2004) Paracetamol a aspirin v nízkých koncentracích (10^{-5} M) vykazovaly různorodé endokrinní účinky na Sertoliho a Leydigovy buňky varlat *in vitro* (Albert et al. 2013). Chronické dávky ethanolu narušovaly kognitivní funkce skrze disrupci dopaminových receptorů buněk prefrontálního kortexu (Trantham-Davidson et al. 2014). Kofein narušoval embryonální srdeční funkci a normální srdeční odezvu na hypoxii blokadou účinku adenosinových receptorů (Buscariollo et al. 2011). Extrakt z cigaretového kouře narušil transkripční aktivitu zprostředkovanou thyroidními hormony (Hayashi et al. 2018).

V databázi KEGG jsou jako endokrinní disruptory, u nichž byla zjištěna interakce s molekulárními mechanismy signální transdukce, uvedeny pesticidy a herbicidy, ftaláty, bisfenoly,

alkylfenoly, styreny, zpomalovače hoření, dioxiny a jsou zde také uvedeny některé mechanismy jejich mikrobiální degradace, během níž může docházet k tvorbě aktivních metabolitů (https://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?br08006.keg). V databázi Evropské agentury pro chemické látky (ECHA) bylo v březnu 2019 celkem 67 záznamů v seznamu „Endocrine disruptor assessment“, obsahujícího chemické látky navrhované k posouzení jako endokrinní disruptory. Tyto látky procházejí hodnocením nebezpečnosti pro vlastnosti narušující funkce endokrinního systému podle nařízení REACH nebo nařízení o biocidních přípravcích. U každé látky má být v tabulce uveden posuzující nebo hodnotící členský stát (zadavatel), výsledek, navrhované následné kroky a datum poslední aktualizace zápisu do seznamu. Důsledkem regulace látek je snaha výrobců regulované látky nahrazovat analogickými sloučeninami s předpokládanými bezpečnými toxikologickými vlastnostmi, např. bisfenol A v termopapíru jeho analogem bisfenolem S (Molina-Molina et al 2019). Účinky strukturálních analogů je nutno opět identifikovat, přičemž často dochází ke zjištění, že některé jejich toxikologické vlastnosti mohou být stejné nebo i horší, jak se ukázalo např. u strukturálních analogů bisfenolu A (Ji et al. 2013, Roelofs et al. 2015; Eladak et al. 2015, Chen et al. 2016, Molina-Molina et al. 2013, Molina-Molina et al. 2019).

3.4. Preventivní snižování expozice endokrinním disruptorům jako jeden z úkolů preventivní medicíny

Preventivní medicína se zabývá problematikou endokrinní disrupce dlouhodobě. Již před více než desetiletím byla formulována první preventivní doporučení pro potenciální snížení škodlivých účinků ED, jako např. podpora kojení, prevence obezity v těhotenství, vyloučení kouření, omezení používání domácí chemie, vyhýbání se znečištěnému ovzduší zejména v obdobích koncepce, v těhotenství a v prvních letech života. Bylo doporučováno poskytovat preventivní poradenství zejména v době plánování těhotenství, aby se zamezilo zvýšené expozici potenciálně škodlivým látkám, a bylo poukazováno na nutnost zavést opatření ke snižování hladin např. polychlorovaných bifenyly, olova a methylrtuti (van den Hazel et al. 2006). Vzhledem k široké, komplexní problematice endokrinní disrupce byla pozornost odborné veřejnosti v rámci preventivní medicíny v oborech pracovního lékařství, neinfekční epidemiologie a toxikologie upřena na zjišťování tohoto typu mírné toxicity u různých skupin chemických látek, identifikaci zdrojů ED a expozičních cest (Černá 2015). V poslední době přibývá studií popisujících vliv aplikovaných preventivních a intervenčních přístupů na pokles koncentrací vybraných ED v lidských tekutinách. Zajímavé závěry přinesly studie sledující vliv životního stylu, zaměstnání, životního prostředí, stravovacích návyků atd., které naznačují, že expozici ED je možné snížit úpravou životního stylu, stravovacích návyků, výběrem a úpravou potravin, kojením a edukační intervencí. Jako významné determinanty zvýšené expozice ED jsou uváděny věk, vysoký BMI a aktuální zdravotní stav (Pirard et al. 2018, Oktar et al. 2017). Koncentrace DEHP a bisfenolu A, metabolitů ftalátů nebo vybraných antibiotik v moči klesla po vyloučení potravin a nápojů v konzervách a plechovkách (Hartle et al. 2016, Rudel et al. 2011). Konzumace vegetariánské stravy po 5 dní souvisela s poklesem koncentrace metabolitů ftalátů a antibiotik v moči (Ji et al. 2010). Obsah pesticidů v ovoci/zelenině se snížil ošetřením alkalickým roztokem jablečné sody (namísto standardního posklizňového 2 min. oplachu roztokem chloru) nebo oloupaním slupky (Yang et al. 2017). Konzumace obilovin, mouky, suchých plodů, ryb, tučných mléčných výrobků, tuků, oleje, konzervované zeleniny a masa byly pozitivně asociovány s vyššími koncentracemi metabolitů BPA a DEHP v moči dětí (Mervish et al.

2014). Vyšší koncentrace rtuti byly zjištěny u osob s více než 3 amalgámovými zubními výplněmi, u osob konzumujících ryby více než jednou týdně a koncentrace kadmia v moči byla výrazně vyšší u aktivních kuřáků (Pirard et al. 2018). Vyšší endokrinní aktivita byla zjištěna u vzorků vzduchu z vnitřního prostředí budov v zimní sezóně (v porovnání se vzorky vzduchu z venkovního ovzduší v centru města), což zdůrazňuje nutnost ventilace vnitřních prostor a eliminace prachu např. mokrým úklidem povrchů v domácnosti, neboť ED rozptýlené ve vzduchu se vážou na prachové částice a jako součást prachu jsou vdechovány (Oziol et al. 2018, Velázquez-Gómez et al. 2018).

Nástroje preventivní medicíny jako intervenční a preventivní opatření, doporučení a výsledky biologického monitorování mohou být účinnější a specifitější u látek, jejichž expozice nepochází z vysokého množství zdrojů. Jako problematická se ukázala např. intervence zaměřená na snížení expozice ftalátům, neboť právě tato skupina látek je v prostředí značně rozšířena a zdá se, že strava není rozhodujícím zdrojem expozice. Koncentrace ftalátů v biologických tekutinách člověka jsou velmi často detekovány i po zavedení intervence. Z některých studií vyplývá, že pouze úpravou stravovacích návyků se nepodaří snížit koncentrace ftalátů (např. DEHP) u běžné populace (Sathyanarayana et al. 2013, Barret et al. 2016), přitom zvýšená hladina DEHP v moči byla spojena s vyššími hladinami steroidů u dospělých mužů (Meeker et al. 20019). Prach, ovzduší z vnitřního prostředí budov a používání spotřebních výrobků byly uvedeny jako další významné zdroje těchto látek (Koch et al. 2013, Harley et al. 2016). Zajímavé jsou závěry americké studie provedené na těhotných ženách z mennonitské komunity. V této komunitě existuje nižší genetická variabilita a její členové konzumují méně komerčně zpracovaných výrobků a polotovarů, preferují domácí stravu z vlastních surovin, nepoužívají ve zvýšené míře přípravky domácí chemie nebo kosmetické přípravky a obecně žijí méně materialistickým a konzumním způsobem života. Martina et al. porovnávali vzorky moči od deseti těhotných žen z této komunity se vzorky těhotných žen zařazených do studie Národního průzkumu zdraví a výživy NHANES 2007-2008. Přestože ženy z mennonitské komunity uváděly používání plastových a vonných výrobků pro domácnost, koncentrace metabolitů ftalátů a bisfenolu A v jejich vzorcích moči byly nižší než u žen ze studie NHANES 2007-2008. Jako tři praktická opatření v běžném životě, která mohou přispět ke snížení expozice endokrinním disruptorům tato studie uváděla např. konzumaci doma připravené stravy z domácích surovin, méně časté používání kosmetických přípravků a produktů osobní péče a preferování jiných typů dopravy než automobilové (Martina et al. 2012).

Několik studií poukázalo na význam preventivní medicíny, zejména pracovního lékařství a profesní epidemiologie, v souvislosti se zjištěními, že konkrétní profese jsou spojeny s vyšší expozicí ED nebo i s rozvojem závažných onemocnění, jež jsou s expozicí ED spojována. Vyšší koncentrace bisfenolů v moči a krvi byly zjištěny u pokladních (Thayer et al. 2015) zřejmě v důsledku práce s účtenkami z termopapíru, pro jehož výrobu se používá i bisfenol A. Profese pokladních i dalších profesí, ve kterých dochází k nadměrnému styku s termopapírem, se týká studie, ve které používání termopapíru a následná konzumace potravin po použití desinfekčního prostředku zvýšilo koncentraci bisfenolu A v séru a moči. (Hormann et al. 2014). Pracovní expozice ED byla stanovena jako možná u 102 (29%) studovaných pracovních pozic. Jako chemické látky, u kterých je pracovní expozice nejpravděpodobnější, byly stanoveny polyaromatické uhlovodíky, pesticidy, ftaláty, organická rozpouštědla, alkylfenoly a kovy (Brouwers et al. 2009). Ženy s vysokou expozicí karcinogenům a ED měly zvýšené riziko karcinomu prsu, přičemž exprese estrogenových receptorů v karcinomech se lišila dle profese. Zvýšené riziko zahrnovaly sektory jako zemědělství, bary, hery, výroba automobilových plastů, konzervování potravin,

kovoobrábění. Nejvyšší riziko premenopauzálního karcinomu prsu bylo u sektoru výroby automobilových plastů a konzervování potravin (Brophy et al. 2012). Expozice organickým rozpouštědly, akrylovým a nylonovým vláknům a polycyklickým aromatickým uhlovodíkům byla rovněž asociována s vyšším rizikem karcinomu prsu (Ekenga et al. 2015, Labrèche et al. 2010)

Výsledky ze studií z různých oborů preventivní medicíny, dokládající všudypřítomnost a akumulaci chemických látek, používaných ve spotřebních výrobcích a detekovaných v životním prostředí, potravním řetězci i biologických vzorcích lidí i zvířat poukazují na potřebu hloubkové analýzy jejich endokrinní aktivity pomocí biologických testovacích systémů relevantních k člověku. Reálná expozice z prostředí však představuje komplexní směs endokrinně aktivních látek. Přestože expozici a kauzální vztah mezi detekovanou látkou a biologickým účinkem není snadné hodnotit z již výše popsaných individuálních, ale i např. socioekonomických či regionálních důvodů (Tyrrell et al. 2013), závěry četných studií naznačují, že koncentrace ED v biologických vzorcích (např. moči, krvi, slinách, seminální plazmě, vlasech) mají souvislost se zvýšeným rizikem výskytu hormonálních poruch, poruch plodnosti, rozvojem metabolického syndromu, obezity, diabetu II. typu, neurologických a psychiatrických poruch, onkologických onemocnění; dále jsou spojovány s nízkou porodní hmotností, předčasným porodem, anomáliemi reprodukčních orgánů, předčasnou nebo opožděnou pubertou, i rozvojem kardiovaskulárních onemocnění, atd. (Kasper-Sonnenberg et al. 2017, Hampl et al. 2013, Rancière et al. 2015; Meeker JD 2012; Meeker et al. 2009, Den Hond et al. 2015; Wolff et al. 2015, Trasande et al. 2012; Orton et al. 2014, Bae & Hong 2015). Četné studie uvádějí, že expozice ED může mít epigenetický přesah, tj. účinky se mohou objevit až v dalších generacích (Bernal & Jirtle 2010, Grealley et al. 2013, Kundakovic et al. 2013, Prusinski et al. 2016, Skinner 2014, Tzatzarakis et al. 2015).

Mnozí se vědecké výsledky z více oborů preventivní medicíny naznačují zásadní význam preventivních opatření, např. edukaci zodpovědných vedoucích pracovníků a přímo dotčených zaměstnanců v oblasti dodržování bezpečnostních předpisů, zavádění preventivních provozních opatření, využívání ochranných pomůcek a využívání případných preventivních lékařských prohlídek. Oborům preventivní medicíny, např. profesní epidemiologii se minimálně v poslední dekádě věnovalo čím dál méně pozornosti a podpory, čímž došlo k relativnímu zanedbávání v oblasti pracovního lékařství, zejména vzhledem k expozici směsím látek. Je zodpovědností orgánů tvořících národní politiku ochrany veřejného zdraví, aby v dialogu s průmyslovými podniky, na průmysl napojenými institucemi a organizacemi z dalších dotčených odvětví dospěly ke společnému konsensu s takovým výsledkem, že na základě posouzení vědeckých důkazů o vlivu prostředí na rozvoj závažných onemocnění budou zaváděna preventivní opatření, mimo jiné i v oblasti endokrinní disrupce. Je žádoucí, aby preventivní opatření byla vnímána pozitivně, byla ekonomicky akceptovatelná, podporovaná zaměstnavateli a existovala pro ně legislativní opora. Příkladem takových opatření bylo např. vydání „protikuřáckého zákona“, díky kterému je významně omezena expozice mnoha karcinogenům i ED ve vnitřním prostředí. Dalším chystaným opatřením na mezinárodní úrovni je např. návrh Směrnice Evropského parlamentu a Rady o omezení dopadu některých plastových výrobků na životní prostředí, na jejímž základě by mělo dojít k náhradě nejproblematictějších plastů neplastovými alternativami. Směrnice se týká omezení makroplastů používaných pro výrobu spotřebních výrobků jako jsou např. vatové tyčinky, příbory, talíře, brčka, boxy na jídlo a pití z polystyrenu, výrobky z tzv. oxo plastů, míchátko, tyčky k balónkům, plastové nádoby na potraviny, nápojové a potravinové plastové obaly, kelímky, sáčky, tabákové výrobky s filtry, vlhčené ubrousky, balónky a lehké plastové tašky. Některé produkty

budou muset mít jasné a standardizované označení, které bude obsahovat návod, jak se má odpad odstraňovat, a informace o negativním dopadu výrobků na životní prostředí a o přítomnosti plastů v nich (např. hygienické vložky, vlhčené ubrousky či balonky). Hlavním cílem Směrnice je předcházení znečišťování moří plastovými výrobky na jedno použití a lovnými zařízeními obsahujícími plasty. Evropská strategie pro omezení plastů zahrnuje též specifická opatření pro mikroplasty, které tvoří významný podíl plastových odpadků v mořích: např. omezení prostřednictvím nařízení REACH 3 týkající se úmyslně přidávaných mikroplastů do výrobků a oxoplastů i opatření pro mikroplasty z jiných zdrojů (pneumatiky, textil a plastové pelety). Přestože Evropská unie není hlavním znečišťovatelem životního prostředí plasty, díky podobným iniciativám přijatým postupně i v dalších zemích může dojít k významnému snížení přechodu kontaminantů do potravního řetězce a tím i snížení expozice kontaminujícími látkami u člověka.

Mezi hlavní úkoly preventivní medicíny v problematice endokrinní disrupce však stále patří edukační přístup, cílený především na odbornou veřejnost (např. pediatry, praktické lékaře, gynekology, endokrinology), kteří, pokud disponují relevantními informacemi a znalostmi, mohou předávat informace v rámci preventivního poradenství citlivým populacím (např. těhotným ženám a rodičům dětí). V průřezové studii provedené ve Francii bylo zjištěno, že pouze 17 % zdravotníků se cítilo schopno poskytnout těhotným ženám odpovědi ohledně snížení expozice ftalátům. Ti zdravotníci, kteří by byli schopni poskytnout poradenství, by nejčastěji (ze 75 %) poskytli informace ohledně stravovacích návyků (např. preferovat domácí stravu), méně často (ze 42 %) by informovali o používání kosmetických přípravků a nejméně často (méně než z 25 %) by informovali o používání spotřebních výrobků. Vnímání expozice ftalátům jako vysoce rizikové nebylo spojeno s poskytováním preventivních doporučení. Z této studie vyplynuly závěry pro praxi v preventivní medicíně, že zdravotníci ve Francii nedisponují dostatečnými znalostmi o ftalátech, nejsou si jisti, jak poskytovat preventivní poradenství, a pokud mají převzít preventivní úlohu, musí být lépe informováni a vyškoleni (Marie et al. 2019). Žádná podobná studie z oboru preventivní medicíny provedená v České republice nebyla během zpracování disertační práce nalezena, nicméně lze předpokládat, že situace v rámci našeho zdravotnického systému je obdobná.

3.5. *In vitro* metody vhodné pro sledování endokrinního potenciálu

Tak, jak přibývají informace o problematice ED, zesiluje i tlak na rozvoj moderních metod efektivního odstraňování ED z prostředí, snižování expozice člověka a také na dostupnost metod testování (Hecker & Hollert 2011, Routledge et al. 1998, OECD 2018). Byly již vyvinuty efektivní *in vitro* metody, založené na biologických testovacích systémech relevantních k člověku (odvozené od lidských buněk a tkání nebo využívající geneticky modifikované organismy, exprimující lidské geny), a některé z nich jsou již zahrnuty do koncepce validovaných testů OECD i ISO (OECD 2018, ISO 2018). Kromě identifikace toxicity ED u jednotlivých chemických látek je také nezbytné sledovat účinky směsí, aby bylo možné plně hodnotit bezpečnost spotřebních výrobků (Klopčic & Dolenc 2017, Kortenkamp et al. 2009, Silva et al. 2002). V experimentální části disertační práce je popsáno, jak byly metody zavedené pro identifikaci nebezpečnosti látek s předpokládaným zdravotním rizikem optimalizovány pro širší využití, zejména pro identifikaci nebezpečnosti směsí, např. výluhů doplňků stravy, spotřebních výrobků na bázi papíru, plastu nebo kosmetických přípravků.

Jako první krok při identifikaci potenciálu ED chemických látek o známé struktuře lze využít různé databázové a výpočetní nástroje (metody *in silico*), které na základě strukturních charakteristik a fyzikálně chemických vlastností poskytnou predikci o předpokládaném možném účinku. Nepostradatelné pro včasnou a efektivní identifikaci ED potence jsou *in vitro* metody, založené na lidských buněčných liniích. Prakticky každá predikční nebo zkušební metoda má své výhody, nevýhody a limitace. Metody *in silico* jsou závislé např. na rozsahu a aktualizaci datových sad. Přestože *in vitro* metody postrádají plnou metabolickou aktivitu a homeostatické mechanismy, mají výhodu v tom, že fungují v kontrolovaném, standardním prostředí a poskytují tak kvantitativní data vždy pro jeden sledovaný účinek, na základě srovnání s negativními, pozitivními kontrolami a referenčními materiály v několika koncentracích. S ohledem na etické aspekty u mnoha chemických látek nelze stanovit základní kinetické parametry definující průběh látek lidským organismem, jako distribuční objem, clearance, eliminační poločas, biologickou dostupnost, procento látky vyloučené do moči, procento látky vázané na bílkoviny, rezidenční čas, atd. Např. u BPA byly díky dobrovolníkům provedeny individuální farmakokinetické studie teprve nedávno (Teeguarden et al. 2015). V reálných situacích dochází k oscilacím a proměnlivosti hladin látek v organismu (Fromme et al. 2007). Výhoda biologických metod *in vitro* je, že jsou schopny podat informaci o aktivitě vzorku ve srovnání s pozitivní kontrolou, u které jsou výše uvedené parametry známy. Na základě *in vitro* dat lze pokračovat ve sledování potence, podobně jako např. u hodnocení účinnosti léčiv. Potence je v současné době jedním z hlavních prediktivních indikátorů úspěšnosti léčby u hodnocení účinnosti léčiv, a mohla by být využívána i v toxikologii (Folmer RHA 2018).

Metody *in silico* a *in vitro* nemohou být využívány jednotlivě, vzhledem k tomu, že podávají informaci o konkrétním mechanismu na chemické, buněčné nebo tkáňové úrovni – sledují jednu tzv. „molekulární iniciační událost“ (MIE, molecular initiating event) nebo „klíčovou událost“

(KE, key event). Pro testování biologických účinků byly proto KE sestaveny do tzv. drah škodlivého účinku (AOP, Adverse Outcome Pathways), kde na sebe jednotlivé KE navazují a tvoří řetězec, vedoucí k celkové biologické odezvě organismu. Teprve nedávno bylo dosaženo mezinárodního konsensu ohledně posuzování ED i ve stanovení drah škodlivého účinku (EC 2018a, EC 2018b, OECD 2018, ECHA, EFSA, JRC 2018). Až v posledních letech pak začalo přibývat studií, které klíčové události (KE) návazně propojují do AOP (Yang et al. 2016, Lorenzetti et al. 2015). Dochází také k postupné validaci biologických *in vitro* metod, které ve své kombinaci mohou přispět k odhalení pleiotropních účinků ED, např. na více receptorů zároveň. Příkladem získání více toxikologických dat pomocí kombinace *in vitro* metod může být např. studie, ve které se sledovaly účinky 7 chemických látek v nízkých koncentracích ve více buněčných liniích současně, a u všech byla zjištěna zvýšená transkripce mRNA pro enzym aromatázu, zvýšená aktivita aromatázy, zvýšení aromatázou indukované syntézy estradiolu a zvýšení proliferace buněk exprimujících estrogenový receptor (Williams & Darbre 2019).

Validované zkušební metody OECD (TG, Test Guidelines) jsou uvedeny v novém pokynu OECD č. 150 (OECD, 2018). Tento dokument rozděluje zkušební metody do 5 úrovní (úroveň 1-5) koncepčního rámce (CF, Conceptual Framework). Metody *in silico*, např. QSAR a další predikční nástroje mohou být využity v úrovni 1, kde bude vzorek hodnocen z hlediska fyzikálně-chemických vlastností (např. molekulové hmotnosti, reaktivity, volatility, biologické rozložitelnosti) (Coleman et al. 2003). Získaná data mohou naznačit, které látky jsou vhodné pro další testování a mají využitelnost např. i při vývoji analogických sloučenin s nižší toxicitou. *In vitro* metody poskytují

informace na úrovni 2, tj. o konkrétním mechanismu nebo signalizační dráze, a jsou založeny na buněčných a tkáňových systémech odvozených ze savčích buněk i buněk jiných organismů. Úrovně 3-5 zahrnují pouze testy *in vivo* s využitím různých biologických modelových organismů (hmyz, korýši, plži, obojživelníci, ryby, hlodavci, ptáci). Výsledky studií *in vivo* jsou vždy ovlivněny prostorově a časově unikátní přítomností molekul v organismu v době odběru vzorku. Mechanistické *in vitro* studie mají výhodu v tom, že výše uvedené faktory mohou do značné míry eliminovat a sledují vždy jen jeden z molekulárních cílů, např. aktivaci receptoru. Za účelem zpřesnění a zvýšení spolehlivosti se v *in vitro* studiích používá více koncentrací vzorků, referenční materiály (např. jako slabá pozitivní kontrola), endogenní ligandy (jako silná pozitivní kontrola), rozpouštědlové kontroly, atd. Validace dalších alternativních *in vitro* metod pokračuje a v budoucnu lze očekávat rozšíření o další klíčové události, které bude možné testovat bez použití zvířat. Slibně vypadá vývoj např. na tkáňové nebo embryonální úrovni, kdy některé buněčné linie, rekonstruované modely lidských tkání nebo embrya v nižších stádiích vývoje (např. embrya *Danio rerio*) vykazují imunoresponzivní aktivitu (např. produkují konkrétní druhy cytokinů), případně sekretují enzymy či proteiny (např. vitellogenin), jejichž snížená či zvýšená aktivita po expozici testované látky, ve srovnání s kontrolou, může naznačovat endokrinní účinek testované látky na úrovni tkáně nebo organismu (OECD 2018).

In vitro metody, uvedené v dokumentu OECD č. 150 pro úroveň 2, obsahují zatím pouze tyto validované metodiky (TG, test guidelines) (OECD 2018):

- OECD TG 493: *In vitro* rekombinantní test detekující chemické látky s afinitou k lidskému estrogenovému receptoru (detekuje dislokaci ligandu, nerozlišuje mezi agonistickou nebo antagonistickou aktivitou);
- OECD TG 455: *In vitro* test detekující agonisty a antagonisty estrogenového receptoru s využitím stabilně transfekované lidské buněčné linie (detekuje aktivaci exprese reportérového genu; aktivátory aryl hydrokarbonového receptoru mohou interferovat a inhibovat aktivaci reportérového genu);
- OECD TG 458: *In vitro* test detekující agonisty a antagonisty androgenového receptoru s využitím stabilně transfekované lidské buněčné linie (detekuje aktivaci exprese reportérového genu);
- OECD TG 456: *In vitro* test steroidogeneze (detekuje inhibici/indukci syntézy estradiolu a testosteronu);
- US EPA OPPTS 890.1150: *In vitro* test detekující vazbu na androgenový receptor (detekuje dislokaci ligandu z receptoru, nerozlišuje mezi agonistickou nebo antagonistickou aktivitou);
- US EPA OPPTS 890.1200: *In vitro* test aktivity enzymu aromatázy (detekuje inhibici aktivity enzymu aromatázy – CYP 19).

Dokument OECD č. 150 také uvádí metody založené na kvasinkových liniích jako perspektivní pro budoucí začlenění do konceptu OECD, vzhledem k tomu, že jsou již standardizovány v systému ISO (OECD 2018, ISO 2018).

Jak je doporučováno v dokumentu OECD GD č. 150, *in vitro* metody je nezbytné využívat při počátečním hodnocení nebezpečnosti, tj. pro odhalení schopnosti vzorku interagovat s endokrinním systémem *in vitro*. Měly by být prováděny zkoušky zahrnující více mechanismů a výsledky by měly být hodnoceny společně, aby poskytly co nejvíce informací o celkové endokrinní aktivitě.

V této práci, zaměřené na nastavení testovacího systému pro včasnou identifikaci a stanovení potenciálu endokrinní disrupce vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích, byly jako modelové skupiny chemických látek využity některé ftaláty, bisfenol A a jeho vybrané analogy. Jako modelové vzorky směsí byly použity vzorky moči, extrakty spotřebních výrobků na bázi papíru s možností styku s potravinami, spotřební výrobky na bázi plastů s předpokládanou dlouhodobou expozicí, doplňky stravy s předpokládaným obsahem fytoaktivních látek a vybrané kosmetické přípravky různého složení. Z dostupných metod byly využity metody: OECD QSAR Toolbox pro *in silico* predikci estrogenního potenciálu, OECD TG 455 pro potvrzení *in silico* predikce, metoda YES dle ISO 19040-1 pro detekci agonistické i antagonistické aktivity vzorků na estrogenový receptor a metoda YAS optimalizovaná dle ISO 19040-1 pro detekci agonistické i antagonistické aktivity vzorků na androgenový receptor (Dvořáková et al. 2016, Dvořáková et al. 2018, ISO 2018, OECD 2018). Z biologických metod byly všechny metody nově zavedeny a optimalizovány pro širší využití.

3.5.1. Endokrinní disrupce u spotřebních výrobků a kosmetických přípravků

Spotřební výrobky nebo kosmetické přípravky představují směsi mnoha složek, proto je hodnocení jejich nebezpečných vlastností a posuzování rizika mnohem složitější než u chemických látek. Pro složky kosmetických přípravků i pro finální výrobky platí v Evropské unii zákaz testování na zvířatech. Je zakázáno kosmetické přípravky nebo jejich složky testované na zvířatech do EU prodávat i dovážet (EU 2009, EU 2010, SCCS 2018). Jedinými přístupy pro ověřování bezpečnosti kosmetických přípravků i jejich ingrediencí jsou metody *in vitro* nebo studie na dobrovolnících. Nové doporučení Vědeckého výboru pro bezpečnost spotřebitele (SCCS 2018) vychází z mezinárodních doporučení pro testování ED (OECD 2018, EC 2018a, EC 2018b) také v případě kosmetických přípravků. Podle názoru SCCS by se s látkami tvořícími součást kosmetických přípravků mělo zacházet jako s jinými látkami, které se týkají lidského zdraví, a proto by měly podléhat posouzení rizika, a nikoli pouze stanovení nebezpečných vlastností. To je v souladu s minulými i současnými hodnoceními SCCS, pokud jde o hodnocení bezpečnosti kosmetických ingrediencí s podezřením na ED toxicitu, např. parabeny, triclosan, homosalát, benzofenony, 4-methylbenzyliden-kafr a 3-benzyliden-kafr, melatonin, resorcinol, cyklomethikon, cyklopentasiloxan.

I když výsledky metod z koncepčních úrovní CF 1 a 2 mohou indikovat endokrinní disrupci jednotlivých složek, nemohou informovat s konečnou platností o tom, zda látka způsobí nepříznivé účinky v intaktním organismu. Proto by měly být všechny důkazy o fyzikálně-chemických a toxikologických vlastnostech látek systematicky integrovány. Bylo by tak možné vytvořit dostatečnou váhu důkazů (WoE, Weight of Evidence) k vyloučení potenciální endokrinní toxicity. V případě kosmetických přípravků, ale i spotřebních výrobků je třeba posoudit biologicky relevantní expozici v podmínkách reálného použití, tj. zda může např. při lokální aplikaci dojít k systémové expozici. Toxikokinetické studie a farmakokinetické modelování (PBPK modeling,

physiologically-based pharmacokinetic models) by mohly pomoci překlenout mezeru mezi *in vivo* a *in vitro* metodami a doplnit údaje o vztahu koncentrací aktivních v *in vitro* testech a systémovou expozicí. Data o přítomnosti a účincích ED na životní prostředí mohou být užitečná pro odhalování toxikologických vlastností ED, nemohou však podat důkazy o účinnosti ED na endokrinní systém člověka (SCCS 2018). Vzhledem k tomu, jak složitá je situace u látek typu směsí, zdá se vhodné zavést metody vhodné pro detekci endokrinního potenciálu u finálních spotřebních výrobků.

Některé chemické látky, přítomné ve spotřebních výrobcích jsou již identifikovány v nařízení REACH jako látky vzbuzující velmi vysoké obavy („SVHC“, Substances of Very High Concern) v důsledku endokrinní disrupce ovlivňující lidské zdraví (např. BPA a ftaláty jako BBP, DBP, DEHP a DiBP) nebo vlivu na životní prostředí (např. 4-terc-oktylfenol a jeho ethoxyláty, 4-nonylfenol a jeho ethoxyláty). U bisfenolu A, již klasifikovaného jako reprotoxická látka, byla jeho estrogenní a antiandrogenní aktivita již doložena mnoha *in vitro* i *in vivo* studiemi. Opakovaně byly koncentrace BPA detekovány v biologických vzorcích u lidí (Luccio-Camelo & Prins 2011; Rubin BS 2011; Paris et al. 2002, Kundakovic et al. 2013, Rancière et al. 2015, Richter et al. 2007, Goldstone et al. 2015, Piecha et al. 2016, Mráz et al. 2016, Vandenberg et al. 2010, Vandenberg et al. 2012, Vandenberg et al. 2013, Vandenberg 2014). Teprve nedávno se začala endokrinní disrupce uvádět jako důvod k zařazení na seznam látek vzbuzujících obavy (ECHA 2015) a na webových stránkách, stále však není k dispozici žádný oficiální seznam prokázaných ED, ze kterého by se dalo při posuzování rizika spotřebních výrobků nebo kosmetických přípravků vycházet. Žádná látka však dosud nebyla klasifikována jako ED.

3.5.2. Nahrazování testování *in vivo* alternativními *in vitro* metodami

In vitro systémy relevantní k člověku jsou využívány v řadě výzkumných oborů zejména v počáteční fázi testování (např. toxikologii, biomedicíně nebo farmakologii). Častější využívání *in vitro* metod odvozených od lidských buněk a tkání se rozšiřuje např. i do oblasti preklinických studií vývoje některých léčiv, neboť při využití *in vivo* modelů (např. hlodavců) zpočátku slibné výsledky nemusí být uspokojivě potvrzeny v dalších fázích klinických studií pro mezidruhové rozdíly (Beken et al. 2016, Schutte et al. 2017, Beilmann et al. 2018).

Nahrazování *in vivo* testování metodami *in vitro* bylo zahájeno se zaváděním koncepce 3R. Ukazuje se, že metody *in vitro* využívající buňky a tkáně lidského původu mají pro člověka vyšší vypovídající schopnost než pokusy na zvířatech s druhovými rozdíly. Koncepce 3R byla zavedena již v roce 1959, aby se během vědeckých experimentů zabránilo zbytečnému utrpení pokusných zvířat. Sestává ze tří bodů („tří R“): „Replacement“ (náhrada), kdy by živá zvířata měla být v experimentu v co největším možném rozsahu nahrazena alternativními *in vitro* metodami založenými na tkáňových kulturách, mikroorganismech, imunologickými technikami, matematickým modelováním, apod.; „Reduction“ (snížení počtu), kdy do pokusu by měl být zahrnut co nejmenší možný počet zvířat, na kterém je možno dosáhnout validních výsledků; a „Refinement“ (zjemnění), kdy experiment by měl probíhat tak, aby zvířata zbytečně netrpěla, tj. měly by být vyloučeny zbytečné stresové faktory a bolestivé techniky (Jennings 2015, Liebsch et al. 2011, EU 2010).

In vitro studie využití v toxikologickém výzkumu již poskytly řadu mechanistických dat, dokládajících ED vlastnosti mnoha látek používaných jako neregulovaná součást spotřebních výrobků, látek více či méně regulovaných (např. na základě dříve stanovených limitů z důvodu

jejich klasifikace jako reprotoxické nebo karcinogenní) či se vyskytujících ve spotřebních výrobcích jako nežádoucí kontaminanty, ale i látek navrhovaných jako náhrady s deklarovanými méně negativními toxickými vlastnostmi. Bylo např. zjištěno, že některé ftaláty (BBP, DBP, DEHP) v nízkých koncentracích (10^{-8} - 10^{-5} mol/l) významně zvýšily proliferaci skrze signalizační dráhu PI3K/AKT a expresi estrogenového receptoru u buněk MCF-7 (Chen & Chien, 2014). Ftaláty BBP, DBP, DIPB působily jako (částeční) agonisté ER a (částeční) antagonisté AR (Dvořáková et al. 2018). Pomocí modelu embryí (*Danio rerio*) byla prokázána estrogení aktivita dalších látek ze skupiny bisfenolů, z nichž některé byly již využívány jako náhrady bisfenolu A (BPF, BPS) (Le Fol et al. 2017, Cano-Nicolau et al. 2016, Trasande et al. 2012, Rochester & Bolden 2015). Některé z bisfenolů fungovaly jako (silní) agonisté ER (např. BPC, BPTMC) i antagonisté AR (Dvořáková et al. 2018, Dvořáková et al. 2016).

4. Hypotézy

Obsahem doktorského projektu bylo sledování potenciálu endokrinní disrupce vybraných látek, které se používají ve výrobních procesech, tvoří součást spotřebních výrobků, případně se mohou ve spotřebních výrobcích nacházet jako kontaminanty. Součástí zadání bylo rovněž posouzení možností sledování expozice látkám s předpokládaným zdravotním rizikem a doporučení preventivních opatření ke snížení expozice.

Byly stanoveny tyto hypotézy:

1. Analogické sloučeniny ze stejné chemické skupiny, z nichž některé jsou využívány jako náhrady látek s endokrinní toxicitou, mohou mít podobné vlastnosti a interagovat s endokrinním systémem.
2. Extrakty spotřebních výrobků představují směs, která může vykazovat endokrinní potenciál. Vzhledem k tomu, že u mnoha látek přítomných ve směsi nemusí být dostupné informace o jejich toxicitě, je vhodné zavést efektivní zkušební metody *in vitro* pro včasnou identifikaci potenciálu endokrinní disrupce chemických látek, používaných ve spotřebních výrobcích. Zavedené metody bude možné optimalizovat i pro stanovení celkového potenciálu endokrinní disrupce u finálních spotřebních výrobků.
3. Látky s prokázanou endokrinní toxicitou, používané jako součást spotřebních výrobků, nebo jejich metabolity, mohou být detekovány v biologických tekutinách člověka a na základě jejich koncentrací lze stanovit prediktivní indikátory zvýšené expozice endokrinním disruptorům.
4. Endokrinní disruptory jsou eliminovány z organismu během několika hodin, nicméně člověk je vystaven jejich kontinuálnímu nepřetržitému přísunu. Dietární expozice je hlavním faktorem ovlivňujícím celkovou expozici člověka endokrinním disruptorům. Vhodnými stravovacími návyky, výběrem, přípravou stravy a jejím složením lze potenciálně snižovat expozici endokrinním disruptorům.

5. Cíle práce

Náplní disertační práce bylo sledování potenciálu endokrinní disrupce u vybraných chemických látek, které se používají ve výrobních procesech nebo tvoří součást spotřebních výrobků. Cíle práce byly zaměřeny na potvrzení nebo vyvrácení stanovených hypotéz. V průběhu zpracování doktorského projektu byly původní cíle práce doplněny o související studie.

Byly stanoveny tyto cíle:

1. Primárním cílem bylo potvrzení nebo vyvrácení hypotézy č. 1. Pro jeho splnění bylo nutné nově zavést efektivní *in vitro* metody pro identifikaci endokrinní disrupce chemických látek. Jako modelové chemické látky byly vybrány sloučeniny ze skupiny bisfenolů a ftalátů, u nichž bylo nejprve nutné metodami *in silico* predikovat jejich možné účinky a získaná data ověřit pomocí nově zavedených *in vitro* metod.
2. Dalším cílem bylo potvrzení nebo vyvrácení hypotézy č. 2. Pro splnění tohoto cíle bylo nutné experimentálně ověřit využitelnost zavedených metod i pro stanovení nebezpečných vlastností (endokrinní disrupce) u vybraných spotřebních výrobků a jejich ingrediencí a tím optimalizovat metody pro širší využití.
3. Dalším cílem bylo potvrzení nebo vyvrácení hypotézy č. 3, tj. že koncentrace endokrinních disruptorů nebo jejich metabolitů mohou být detekovány v biologických tekutinách běžné populace, a proto je možné stanovit prediktivní indikátory zvýšené expozice. Pro splnění tohoto cíle bylo nutno provést výběr vhodného vzorku biologické tekutiny a následnou analýzu.
4. Doplnkovým minoritním cílem, zvoleným s ohledem na vědecký vývoj v oblasti endokrinní disrupce, bylo ověření hypotézy, že dietární expozice je relevantním faktorem ovlivňujícím celkovou expozici člověka endokrinním disruptorům, a proto vhodnými stravovacími návyky lze potenciálně snížit expozici. Pro splnění tohoto cíle bylo nutné provést doplňkovou studii sledující expozici bisfenolům a ftalátům. Jako zdroj ED ve stravě byly předpokládány zejména konzervované potraviny a nápoje v plechovkách.
5. Závěrečným cílem doktorského projektu bylo připravit informační materiál, vhodný pro edukaci odborné veřejnosti a preventivní poradenství ohledně potenciálního snižování expozice ED. Za tímto účelem byl připraven návrh informačního materiálu využitelný v klinické praxi, vycházející z důsledné rešerše vědeckých informací, čítající více než 200 literárních zdrojů.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. Metodika

Materiál, metody, vzorky použité v experimentech, příprava vzorků, design experimentů i studií a dosažené výsledky jsou popsány v pracích, které jsou součástí disertační práce (Dvořáková et al. 2016, Dvořáková et al. 2018, Kejlová et al. 2019). V této kapitole jsou všechny metodické postupy rekapitulovány a shrnuty.

6.1. Predikce potenciálních ligandů estrogenového receptoru *in silico*

Pro *in silico* predikci potenciálních ligandů a vazebnou afinitu k estrogenovému receptoru α na základě chemické struktury, molekulové hmotnosti a rozdělovacího koeficientu oktanol-voda byl využit databázový nástroj OECD QSAR Toolbox (verze Toolbox 3.3.2). Jde o otevřený *in silico* nástroj pro odhady (predikce), který rozděluje chemické látky do několika kategorií podle schopnosti vázat se na estrogenový receptor. Tento průběžně aktualizovaný databázový nástroj seskupuje chemické látky do chemických kategorií, jejichž fyzikálně-chemické a toxikologické vlastnosti vycházejí ze strukturní podobnosti. Využití OECD QSAR Toolbox zahrnuje např. popis chemické struktury sloučenin, dobrovolně poskytované výsledky z výpočetních modelů, analýz trendů, read-across analýz, experimentální výsledky, výsledky hodnocení a kategorizací včetně případného zahrnutí látek do různých (národních) seznamů, vyhledávání možných analogů, seskupování sloučenin podle mechanismu účinku nebo společného metabolitu, atd. Pro svou širokou využitelnost a průběžnou aktualizaci je OECD QSAR Toolbox doporučován i využíván pro legislativní posuzování nezávadnosti chemických přípravků (Tichý M & Rucki M 2009, OECD 2007, OECD 2017).

Pro predikci potenciálních ligandů estrogenového receptoru jsou využívány základní strukturní charakteristiky: např. chemické látky s molekulovou hmotností mezi 200 a 500 Da, dvěma benzenovými jádry s navázanými hydroxylovými skupinami jsou predikovány jako *velmi silné ligandy*; látky s molekulovou hmotností mezi 200 až 500 Da, 5- až 6členným benzenovým jádrem s neomezeným počtem volných hydroxylových nebo amino- skupin jsou predikovány jako *silné ligandy*; látky s molekulovou hmotností mezi 170 až 200 Da, 5 až 6 atomy uhlíku v benzenovém jádře a neomezeným počtem hydroxylových nebo amino- skupin jsou predikovány jako *středně silné ligandy*; látky s molekulovou hmotností do 170 Da, 5 až 6 atomy uhlíku v benzenovém jádře a neomezeným počtem hydroxylových nebo amino- skupin jsou predikovány jako *slabé ligandy*. Pokud chemická látka nesplňuje základní strukturní a parametrické ukazatele, je predikována jako *nevázající se na estrogenový receptor* (např. látky s vyšší molekulovou hmotností než 500 Da, látky postrádající hydroxylové nebo amino- skupiny, postrádající cyklickou strukturu jádra, atd.).

6.2. Verifikace *in silico* predikce metodou *in vitro* s využitím lidské buněčné linie (dle OECD TG 455)

Pro verifikaci *in silico* predikce byla využita nově zavedená *in vitro* zkouška pro detekci chemických látek s agonistickou aktivitou na estrogenový receptor pomocí lidské buněčné linie VM7Luc4E2 (Rogers & Denison 2000, OECD 2018). Zkouška byla provedena dle metodiky OECD (Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In vitro*

Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists). Rekombinantní lidská buněčná linie VM7Luc4E2 (varianta MCF-7, buněk z karcinomu prsu) exprimuje lidské endogenní estrogenové receptory hER α a v menší míře hER β . Buňky jsou stabilně transfekovány plasmidem pGudLuc7.0 obsahujícím gen pro rezistenci k antibiotiku G418 (tzv. "selektor" pro selekci pouze buněk obsahujících plazmid) a reportérový gen (luc) pod kontrolou estrogenových responzivních elementů (ARE) umístěných na silném promotoru odvozeného z MMTV ("Murine mammary tumor virus" – retrovirus myšního tumoru prsní žlázy), který dlouhodobě vykazuje nízkou zkříženou aktivitu s jinými steroidy a nesteroidními hormony. Metoda je vhodná pro detekci estrogenní aktivity chemických látek i směsí o neznámém složení. Zkouška je určena k detekci transkripčně zprostředkované aktivity estrogenových receptorů α a β a detekuje navázání ligandu na ER, následnou translokaci receptorového komplexu s ligandem do jádra, navázání na specifické estrogenové responzivní elementy v jádře, transaktivaci reportérového genu (luc), produkci enzymu luciferázy (jako produktu reportérového genu) a následnou chemiluminiscenci, která může být kvantifikována za použití luminometru s injektorem. Pozitivní odpověď pro stanovení agonistické aktivity je identifikována křivkou obsahující alespoň tři body (průměr \pm SD), stejně jako změnou v amplitudě RLU (normalizovaná relativní světelná jednotka) alespoň 20 % z maximální hodnoty pro referenční látku (17 β -estradiol [E2; CAS 50-28-2]), použitou jako pozitivní kontrola. Zkouška byla optimalizována pro testování širokého rozsahu látek za předpokladu jejich rozpustnosti v DMSO, EtOH (finální koncentrace 1 %), vodě (finální koncentrace 50 %) nebo kultivačním médiu. Buněčná kultura se 5 dní před aplikací vzorků kultivuje v médiu a plastu s nízkou estrogenní aktivitou. Pro test se používá buněčná kultura o konfluenci min. 80 % a min. počtu buněk 750×10^3 / ml. Jako pozitivní kontrola se používá 17 β -estradiol [E2; CAS 50-28-2] minimálně v 7 koncentracích (v rozsahu např. 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} mg/ml). Vzorky rozpuštěné v DMEM se aplikují v minimálně 4 necytotoxických koncentracích, např. 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} nebo 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} mg/ml. Negativní kontrola (kontrola reagentů) je médium s max. 1% DMSO. Buněčná kultura se inkubuje 24 hodin při 37°C, 5% CO₂. Před začátkem inkubace a po jejím ukončení se provádí mikroskopická kontrola viability buněk. Minimální viabilita (konfluence) musí být 70 %. Indukce exprese reportérového genu se hodnotí jako chemiluminiscence pomocí detekčního systému pro stanovení luciferázy (Promega Luciferase Assay System) a měří se pomocí luminometru s injektorem (Promega).

6.3. Identifikace estrogenního potenciálu metodou *in vitro* pomocí metody založené na *Saccharomyces cerevisiae* (YES)

Pro identifikaci a potvrzení estrogenního (agonistického) potenciálu byla využita nově zavedená *in vitro* zkouška založená na geneticky modifikovaném kmenu (YES) kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Metodu je možné použít pro detekci agonistické aktivity různých typů vzorků (koncentrovaných vzorků vod, vodných výluhů, roztoků chemických látek, extraktů, kosmetických přípravků, směsí o neznámém složení). Zkouška sleduje estrogenní aktivitu vzorků na geneticky modifikovaný kmen (YES) kvasinek *S. cerevisiae*, do jehož chromozomu byla stabilně integrována DNA sekvence genu pro lidský estrogenový receptor α (hER α). Inzertovaný plazmid nese reportérový gen lacZ, kódující enzym β -galaktozidázu a estrogenový (YES) responzivní element (Routledge EJ & Sumpter JP 1996; Sohoni P & Sumpter JP 1998). Po vazbě ligandu hER α interaguje s responzivním elementem na expresním plazmidu a moduluje transkripci reportérového

genu pro enzym β -galaktozidázu (lacZ). Enzym je sekretován do média, kde konvertuje žlutý substrát na červený produkt, který je kvantifikován při 570 nm pomocí spektrofotometru. Absorbance změřená při vlnové délce 570 nm koreluje přímo s množstvím β -galaktozidázy a tím také s estrogenní aktivitou vzorku. Metoda rovněž detekuje cytotoxický efekt, tj. zastavení růstu nebo lýzu kvasinkových buněk. Jako pozitivní kontrola ve variantě metody YES se používá 17 β -estradiol [E2; CAS 50-28-2] v 7 koncentracích (10^{-11} , 3.16×10^{-11} , 10^{-10} , 3.16×10^{-10} , 10^{-9} , 3.16×10^{-9} , 10^{-8} mol/l). Vzorky rozpuštěné ve 100% DMSO se aplikují ve finálních necytotoxických 8 koncentracích (3.16×10^{-8} , 10^{-7} , 3.16×10^{-7} , 10^{-6} , 3.16×10^{-6} , 10^{-5} , 3.16×10^{-5} , 10^{-4} mg/ml, max. finální koncentrace DMSO 1 %).

Metodika je shodná pro všechny varianty metody (YES, anti-YES, YAS, anti-YAS): množící se kvasinkové buňky jsou exponované necytotoxickým koncentracím vzorku. Pro test se používá kultura, jejíž OD změřená při 690 nm je min. 0,2. Jako negativní kontrola (kontrola reagensů) se použije médium s max. koncentrací 1 % DMSO. Kultura je inkubována v semiaerobním prostředí, za kontroly vyrovnané vlhkosti a s ochranou proti evaporaci, v 96 jamkové mikroděstičce po dobu 48 h při 31 °C a jemném třepání na orbitální třepačce v přítomnosti substrátu pro enzym β -galaktozidázu. Před začátkem inkubace a po jejím ukončení je provedena spektrofotometrická kontrola životnosti buněk. Před začátkem inkubace se v případě potřeby provádí spektrofotometrická kontrola interference vzorku. Indukce exprese reportérového genu pro β -galaktozidázu způsobí sekreci enzymu β -galaktozidázy konvertující žlutý substrát CPRG (chlorophenol red- β -galactopyranoside) na červený produkt. Změna zbarvení se kvantifikuje spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm (Xenometrix 2015). Viabilita kultury se měří a kvantifikuje při vlnové délce 690 nm. Pro měření byl využit spektrofotometr Eon (BioTek) a software Gen5.

6.4. Identifikace anti-estrogenního potenciálu *in vitro* pomocí metody založené na *Saccharomyces cerevisiae* (anti YES)

Pro identifikaci anti-estrogenního (antagonistického) potenciálu byla využita *in vitro* metoda založená na geneticky modifikovaném kmenu (YES) kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (identickým jako u předchozí metody popsané v odstavci 6.3.). Pro detekci anti-estrogenní aktivity je do média přidán standardní přírůstek silného ligandu (17 β -estradiol [E2; CAS 50-28-2] ve finální koncentraci 1×10^{-9} mol/l), přičemž metoda detekuje kompetitivní inhibici vazby standardního přírůstku (způsobenou vzorkem) na hER α (antagonismus) ve srovnání s negativní kontrolou (médium s 1% DMSO) a pozitivní kontrolou, kterou je referenční materiál s klinicky potvrzenou anti-estrogenní aktivitou (4-hydroxytamoxifen [HT; CAS 68392-35-8] v 7 koncentracích (10^{-9} , 3.16×10^{-9} , 10^{-8} , 3.16×10^{-8} , 10^{-7} , 3.16×10^{-7} , 10^{-6} mol/l). Metodika je shodná jak popsáno v odstavci 6.3 v části Metodika.

6.5. Identifikace androgenního potenciálu *in vitro* pomocí metody založené na *Saccharomyces cerevisiae* (YAS)

Pro identifikaci androgenního (agonistického) potenciálu byla využita nově zavedená *in vitro* zkouška založená na geneticky modifikovaném kmenu (YAS) kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Metodu je možné použít pro detekci agonistické aktivity různých typů vzorků (koncentrovaných vzorků vod, vodných výluhů, roztoků chemických látek, extraktů, kosmetických

přípravků, směsí o neznámém složení). Zkouška sleduje androgenní aktivitu vzorků na geneticky modifikovaný kmen (YAS) kvasinek *S. cerevisiae*, do jehož chromozomu byla stabilně integrována DNA sekvence genu pro lidský estrogenový receptor α (hAR). Inzertovaný plazmid nese reportérový gen lacZ, kódující enzym β -galaktozidázu a estrogenový (YAS) responzivní element (Routledge EJ & Sumpter JP 1996; Sohoni P. & Sumpter JP 1998). Po vazbě ligandu hAR interaguje s responzivním elementem na expresním plazmidu a moduluje transkripci reportérového genu pro enzym β -galaktozidázu (lacZ). Metodika je popsána v odstavci 6.3 v části Metodika.

Jako pozitivní kontrola byl použit 5 α -dihydrotestosteron [DHT; CAS 521-18-6] v 7 koncentracích (10^{-9} , 3.16×10^{-9} , 10^{-8} , 3.16×10^{-8} , 10^{-7} , 3.16×10^{-7} , 10^{-6} mol/l). Vzorek rozpuštěný v DMSO byl aplikován v necytotoxických 8 koncentracích (3.16×10^{-8} , 10^{-7} , 3.16×10^{-7} , 10^{-6} , 3.16×10^{-6} , 10×10^{-5} , 3.16×10^{-5} , 10^{-4} mg/ml). Jako negativní kontrola bylo použito médium s max. koncentrací 1 % DMSO.

6.6. Identifikace anti-androgenního potenciálu *in vitro* pomocí metody založené na *Saccharomyces cerevisiae* (anti YAS)

Pro identifikaci anti-estrogenního (antagonistického) potenciálu byla využita *in vitro* metoda založená na geneticky modifikovaném kmenu (YAS) kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (identickým jako u předchozí metody popsané v odstavci 6.5.). Pro detekci anti-androgenní aktivity je do média přidán standardní přírůvek silného ligandu (5 α -dihydrotestosteron [DHT; CAS 521-18-6] ve finální koncentraci 3×10^{-8} mol/l), přičemž metoda detekuje kompetitivní inhibici vazby standardního přírůvku (způsobenou vzorkem) na hAR (antagonismus) ve srovnání s negativní kontrolou (médium s 1% DMSO) a pozitivní kontrolou, kterou je referenční materiál s klinicky potvrzenou anti-androgenní aktivitou (flutamid [FL; CAS 13311-84-7] v 7 koncentracích (10^{-7} , 3.16×10^{-7} , 10^{-6} , 3.16×10^{-6} , 10^{-5} , 3.16×10^{-5} , 10^{-4} mol/l). Metodika je popsána v odstavci 6.3 v části Metodika.

6.7. Modifikace metod založených na *Saccharomyces cerevisiae* (varianta XL)

Modifikovaná metoda (XL YES, XL anti YES, XL YAS, XL anti YAS) využívá postup, kdy se přímo v testovací 96 jamkové desce připraví ředění vzorků a následně se doplní médium a ředěná kultura kvasinkových buněk. Inkubace je zkrácena na min. 18 hodin, což urychlí získání výsledků. Po inkubaci se spektrofotometricky detekuje viabilita buněk. Cytotoxicita je měřena jako redukce rozptylu světla při vlnové délce 690 nm pomocí spektrofotometru. Následně se použije lyzační směs, která usnadní sekreci intracelulárně syntetizované β -galaktozidázy do média a zvýší sensitivitu metody. Koncentrace pozitivní kontroly a standardního přírůvku se liší od nemodifikované verze YES, anti YES, YAS, anti YAS. Větší rozsah koncentrací pozitivní kontroly (8) a využití jejich nižších koncentrací usnadní detekci vzorků s nízkými koncentracemi aktivních látek (Xenometrix 2017).

Finální koncentrace standardního přírůvku silného ligandu pro variantu XL anti YES (17 β -estradiol [E2; CAS 50-28-2]) je 3.3×10^{-10} mol/l). Finální koncentrace standardního přírůvku silného ligandu pro variantu XL anti YAS (5 α -dihydrotestosteron [DHT; CAS 521-18-6]) je 3.3×10^{-9} mol/l). Koncentrace pozitivní kontroly pro variantu XL YES (17 β -estradiol [E2; CAS 50-28-2]) jsou 6.7×10^{-9} , 2.1×10^{-9} , 6.7×10^{-10} , 2.1×10^{-10} , 6.7×10^{-11} , 2.1×10^{-11} , 6.7×10^{-12} , 2.1×10^{-12} mol/l). Koncentrace pozitivní kontroly pro variantu XL YAS (5 α -dihydrotestosteron [DHT; CAS

521-18-6]) jsou 6.7×10^{-8} , 2.1×10^{-8} , 6.7×10^{-9} , 2.1×10^{-9} , 6.7×10^{-10} , 2.1×10^{-10} , 6.7×10^{-11} , 2.1×10^{-11} mol/l). Koncentrace pozitivní kontroly pro variantu XL anti YES (4-hydroxytamoxifen [HT; CAS 68392-35-8]) jsou 6.7×10^{-6} , 2.1×10^{-6} , 6.7×10^{-7} , 2.1×10^{-7} , 6.7×10^{-8} , 2.1×10^{-8} , 6.7×10^{-9} , 2.1×10^{-9} mol/l). Koncentrace pozitivní kontroly pro variantu XL anti YAS (flutamid [FL; CAS 13311-84-7]) jsou 6.7×10^{-5} , 2.1×10^{-5} , 6.7×10^{-6} , 2.1×10^{-6} , 6.7×10^{-7} , 2.1×10^{-7} , 6.7×10^{-8} , 2.1×10^{-8} mol/l) (Xenometrix 2017).

6.8. Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích

Pro včasnou identifikaci potenciálu endokrinní disrupce vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích, byly vybrány sloučeniny ze skupiny bisfenolů a ftalátů. Seznam vybraných chemických látek, včetně jejich identifikace (CAS), molekulární hmotnosti (MW), sumárního a strukturního vzorce je uveden v tabulce 1. Pro stanovení potenciálu endokrinní disrupce (agonistické i antagonistické aktivity vůči estrogenovému i androgenovému receptoru) byly využity všechny metody popsané v bodech 6.1. až 6.6., tj. metoda *in silico*, poskytující predikci vazby na estrogenový receptor (OECD QSAR Toolbox, OECD 2017); metoda *in vitro*, sledující indukci exprese reportérového genu pro enzym luciferázu založená na lidské buněčné linii (OECD TG 455) a metody *in vitro*, založené na dvou kmenech kvasinek *S. cerevisiae* (Metoda YES a anti-YES, YAS a anti-YAS).

	Látka	Zkratka	CAS	MW	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
1	Bisfenol A	BPA	80-05-7	228.29	$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$	
2	Bisfenol AF	BPAF	1478-61-1	336.23	$(\text{CF}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$	
3	Bisfenol AP	BPAP	1571-75-1	290.36	$\text{CH}_3\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$	
4	Bisfenol BP	BPBP	1844-01-5	352.43	$\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{O}_2$	
5	Bisfenol C	BPC	79-97-0	256.34	$(\text{CH}_3)_2\text{C}[\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)\text{OH}]_2$	
6	Bisfenol E	BPE	2081-08-5	214.26	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$	
7	Bisfenol F	BPF	620-92-8	200.23	$\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$	
8	Bisfenol FL	BPFL	3236-71-3	350.41	$\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{O}_2$	
9	Bisfenol G	BPG	127-54-8	312.45	$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_2$	
10	Bisfenol M	BPM	13595-25-0	346.46	$\text{C}_6\text{H}_4[\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}]_2$	
11	Bisfenol P	BPP	2167-51-3	346.46	$\text{C}_6\text{H}_4[\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}]_2$	
12	Bisfenol S	BPS	80-09-1	250.27	$\text{O}_2\text{S}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$	
13	Bisfenol TMC	BPTMC	129188-99-4	310.43	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_2$	
14	Bisfenol Z	BPZ	843-55-0	268.35	$\text{C}_6\text{H}_{10}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$	
15	Diethyl ftalát	DEP	84-66-2	222,24	$\text{C}_6\text{H}_4-1,2-(\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5)_2$	
16	Bis(2-ethylhexyl) ftalát	DEHP	117-81-7	390,56	$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$	
17	Benzyl butyl ftalát	BBP	85-68-7	312,36	$2\cdot[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{O}_2\text{C}]$	
18	Dibutyl ftalát	DBP	84-74-2	278,34	$\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	
19	Diisobutyl ftalát	DIBP	84-69-5	278,34	$\text{C}_6\text{H}_4-1,2\cdot[\text{CO}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3]_2$	
20	Diisononyl ftalát	DINP	28553-12-0	418,61	$\text{C}_6\text{H}_4-1,2\cdot[\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2]_2$	
21	Diisodecyl ftalát	DIDP	26761-40-0	446,66	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{CO}_2\text{C}_9\text{H}_{19})_2$	

Tabulka 1. Seznam chemických látek pro identifikaci jejich endokrinního potenciálu.

6.9. Příprava extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru

Pro analýzu endokrinního potenciálu za využití *in vitro* metod založených na geneticky modifikovaných kmenech kvasinek *S. cerevisiae* (viz odst. 6.3. až 6.6.) byly vybrány vzorky ubrousků s barevným potiskem (černá, žlutá, modrá, červená) a bez potisku, představující modelové výrobky na bázi papíru, které mohou přijít do styku s potravinami. Postup je možné použít na výrobky z papíru a lepenky (např. ubrousky, obaly, podtácky, krabičky, apod.). Postup extrakce výrobků na bázi papíru a lepenky určených pro styk s potravinami byl podrobně popsán v článku Vápenka et al. 2016 a Kejlová et al. 2019. Vzorky papíru (1 g) byly extrahovány ve 20 ml směsi acetonitril – ultračistá voda 1:1 (v/v) a sonifikovány po dobu 15 min v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě. Přidáním 4 g MgSO₄ a 1 g NaCl bylo dosaženo oddělení fází. Po centrifugaci se odebrala horní vrstva acetonitrilu pro následné chemické analýzy. Pro zkoušky endokrinního potenciálu *in vitro* metodami založenými na geneticky modifikovaných kmenech kvasinek *S. cerevisiae* (viz odst. 6.3. až 6.6.) je jako nejvhodnější rozpouštědlo doporučován DMSO v maximální (necytotoxické) koncentraci 1 %. Vzorky rozpuštěné ve 100% DMSO musí být proto v 96 jamkové testovací desce 100x ředěny do finální koncentrace 1% DMSO. Původní acetonitrilový extrakt se použil následovně: ze 3 ml acetonitrilového extraktu byl acetonitril odpařen pod proudem dusíku. Odparek se rozpustil ve 300 µl 100 % DMSO (tj. původní 100% acetonitrilový extrakt se 10 x koncentroval ve 100% DMSO). V dalším kroku se připravila zředovací destička s logaritmickými koncentracemi ve 100% DMSO. Ze zředovací destičky bylo přeneseno vždy 2 µl vzorku do testovacích destiček s finálním objemem reakční směsi 200 µl, tj. logaritmické koncentrace byly finálně 100x ředěny, čímž bylo dosaženo maximální (necytotoxické) koncentrace DMSO 1 %. Finální testované koncentrace extraktu byly 0,316 % - 1 % - 3,16 % - 10 %. Nejvyšší testovaná koncentrace (10 %) představuje desetinasobné ředění původního acetonitrilového extraktu analyzovaného metodami HPLC a GC. Seznam vzorků a jejich popis je uveden v tabulce 2.

Číslo vzorku	Typ ubrousku	Barva ubrousku	Označení vzorku v grafech
1	A	bílá	A (no print)
2	A	černá	A (black print)
3	B	červená	B (red print)
4	B	modrá	B (blue print)
5	B	bílá	B (no print)
6	C	žlutá	C (yellow print)

Tabulka 2. Seznam vzorků ubrousků.

6.10. Příprava extraktů spotřebních výrobků na bázi plastu

Pro analýzu endokrinního potenciálu za využití *in vitro* metod založených na geneticky modifikovaných kmenech kvasinek *S. cerevisiae* (viz odst. 6.3. až 6.6.) byly vybrány vzorky erotických pomůcek s předpokládanou dlouhodobou expozicí (venušiny kuličky - “Kegel balls”) i s krátkodobou expozicí (vibrátory, umělá vagina) vyrobené z barevného plastu. Typ plastu byl identifikován v akreditované laboratoři SZÚ, Centru toxikologie a zdravotní bezpečnosti, Oddělení chemické bezpečnosti výrobků. Před přípravou extraktů byly vzorky 1 x omyty 70% ethanolem a 2 x destilovanou vodou pro prevenci kontaminace z předchozí manipulace při výrobě a distribuci. Plastové části přicházející do kontaktu se sliznicí byly asepticky nastříhány na kousky max. 5 mm x 5 mm. 1 g vzorku byl extrahován v 5 ml 100 % DMSO po dobu 24 hodin při 37°C. Extrakt byl připraven čerstvý a použit do testu do 24 hodin po ukončení extrakce. Pro zkoušky endokrinního

potenciálu *in vitro* metodami založenými na geneticky modifikovaných kmenech kvasinek *S. cerevisiae* (viz odst. 6.3. až 6.6.) je jako nejvhodnější rozpouštědlo doporučován DMSO v maximální (necytotoxické) koncentraci 1 %. Původní extrakt ve 100% DMSO se proto použil následovně: připravila se zředovací destička, ve které byly připraveny logaritmické koncentrace ve 100% DMSO. Ze zředovací destičky bylo přeneseno vždy 2 µl do testovacích 96 jamkových destiček s finálním objemem reakční směsi 200 µl, tj. logaritmické koncentrace byly finálně 100x ředěny, čímž bylo dosaženo maximální (necytotoxické) koncentrace DMSO 1 %. Finální testované koncentrace extraktu byly 0,0316 % - 0,1 % - 0,316 % - 1 % původního extraktu. Seznam vzorků a jejich popis je uveden v tabulce 3.

Číslo vzorku	Typ výrobku	Barva	Typ plastu	Označení vzorku v grafech
1	Venušiny kuličky	modrá	čistý 100% silikon	Kegel balls blue 1
2	Venušiny kuličky	fialová	čistý 100% silikon	Kegel balls violet 1
3	Venušiny kuličky	červená	čistý 100% silikon	Kegel balls red 1
4	Venušiny kuličky	fuchsiová	čistý 100% silikon	Venus balls purple 1
5	Vibrátor	fialová	čistý 100% silikon + ABS	Vibrator violet 1
6	Vibrátor	fuchsiová	čistý 100% silikon	Twinhead purple
7	Umělá vagina	růžová	termoplastický kaučuk	Artificial vagina
8	Vibrátor	transparentní fialová	elastomer na bázi styrenu	Vibrator violet
9	Venušiny kuličky	červená	ABS	Kegel balls red
10	Venušiny kuličky	fialová	polyester tereftalát, ABS	Kegel balls violet

Tabulka 3. Seznam spotřebních výrobků na bázi plastu.

6.11. Příprava vzorků kosmetických přípravků

Pro analýzu endokrinního potenciálu za využití *in vitro* metod založených na geneticky modifikovaných kmenech kvasinek *S. cerevisiae* byla využita modifikovaná metoda popsána v odst. 6.7. spočívající v eliminaci preanalytického kroku přípravy zředovací destičky, zkrácení inkubační doby, změně koncentrací pozitivní kontroly a standardního přídatku a zařazení lyzačního kroku pro zvýšení sensitivity. Byly vybrány vzorky různých typů kosmetických přípravků: kolínská voda, bylinný elixír olejové konzistence s obsahem konopí “Hemp elixír”, bylinný krém pro normální pleť, pleťový krém s “fyto kolagenem” a výtažky ze sóji, parfém deodorant, toaletní voda, parfémovaná voda, parfém. Vzhledem k různému složení kosmetických přípravků byly vzorky připravovány tak, aby finální testovaná koncentrace byla co možná nejvyšší, avšak necytotoxická, jak je doporučeno i v metodických instrukcích pro přípravu vzorků (Xenometrix 2017). Pro odhad cytotoxicity byla využita data ze Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* (ČSN EN ISO 10993–5: Část 5, články 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 8.5, 9, 10, Příloha A), provedené ve zkušební laboratoři akreditované ČIA podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025 (Laboratoře toxikologie, Centrum laboratorních činností, Státní zdravotní ústav Praha, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10).

Z kosmetických přípravků typu emulzí (krémy) byly připraveny extrakty (2:1) ve 100% DMSO (2 ml vzorku byly extrahovány v 1 ml DMSO po dobu 24 hodin při 37°C). Vzorek olejové konzistence “Hemp elixír”, byl extrahován v poměru 9:1 (9 ml vzorku v 1 ml DMSO po dobu 24 hodin při 37°C). Vzorek typu “Kolínská” byl připraven stejně jako vzorky parfémů, parfémovaných vod a toaletních vod. Připravené extrakty byly označeny jako 100% extrakt a použity jako pro testování. Vzorky 1 - 8 byly testovány *in vitro* metodami založenými na geneticky modifikovaných kmenech kvasinek *S. cerevisiae* (viz odst. 6.3. až 6.6.) a pro vzorky 9 - 13 byla použita metoda s modifikací pro zvýšení sensitivity, jak popsáno v bodě 6.7.

U vzorků typu deodorantu, parfémů, parfémovaných vod, toaletních vod a kolínská voda byla nejprve provedena orientační zkouška na cytotoxicitu *in vitro* (ČSN EN ISO 10993–5: Část 5, články 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 8.5, 9, 10, Příloha A), provedená ve zkušební laboratoři akreditované ČIA podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025 (Laboratoře toxikologie, Centrum laboratorních činností, Státní zdravotní ústav Praha, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10).

Na základě výsledků cytotoxicity byla navržena necytotoxická finální koncentrace vhodná pro testování (100 µg/ml), která bude testována jako nejvyšší, aby byla zajištěna dostatečná životnost buněk, určující validitu experimentu. Ze vzorků typu deodorantu, parfémů, parfémovaných vod, toaletních vod a kolínská voda se proto nejprve připravily pracovní roztoky ve 100% DMSO a byly označeny jako 100% vzorek. Za předpokladu, že se 100% vzorky budou dále 100x ředit (neboť se bude aplikovat 2 µl 100% vzorku do finálního objemu v jamce 200 µl), byly 100% vzorky připraveny v koncentraci 10 mg/ml. Po aplikaci 2 µl 100% vzorku do finálního objemu v jamce 200 µl bylo dosaženo finální testované koncentrace 0,0316 % - 0,1 % - 0,316 % - 1 % pracovních roztoků (100 % vzorků), což odpovídá tomu, že nejvyšší testovaná koncentrace (1%) odpovídá ředění 10000x původních vzorků typu deodorantu, parfémů, parfémovaných vod, toaletních vod a kolínská voda (100x na koncentraci 10 mg/ml, čímž vznikly pracovní roztoky “100% vzorky” a následně znovu 100x na koncentraci 100 µg/ml původního vzorku). Seznam vzorků s jejich popisem je uveden v tabulce 4.

Číslo vzorku	Popis vzorku	Označení vzorku v grafech
1	Parfémovaná voda 1	1
2	Parfémovaná voda 2	2
3	Parfémovaná voda 3	3
4	Parfémovaná voda 4	4
5	Parfém deodorant pánský 5	5
6	Parfémovaná voda 6	6
7	Parfém dámský s deklarovaným obsahem feromonu (Androstenol)	7 – woman
8	Parfém pánský s deklarovaným obsahem feromonu (Androstenone)	8 – man
9	Toaletní voda 9	9
10	Kolínská voda	Kolínská
11	Směs rostlinných olejů a léčivého konopí	Hemp elixír
12	Bylinný krém pro normální pleť	Byl. krém
13	Pleťový krém s obsahem sóji	Krém sója

Tabulka 4. Seznam kosmetických přípravků.

6.12. Příprava extraktů vzorků doplňků stravy

Pro identifikaci endokrinního potenciálu byly vybrány vzorky doplňků stravy ze sortimentu výrobků tradiční čínské medicíny s deklarovaným obsahem bylinných výtažků a předpokládaným obsahem fytoaktivních látek. Vzorky byly zakoupeny prostřednictvím internetového obchodu. Seznam vzorků s popisem jejich deklarovaného složení je uveden v tabulce 5. Pro zkoušky endokrinního potenciálu *in vitro* metodami založenými na geneticky odifikovaných kmenech kvasinek *S. cerevisiae* je jako nejvhodnější rozpouštědlo doporučován DMSO v maximální (necytotoxické) koncentraci 1 %. 1 g vzorku (ve formě prášku nebo tablet) byl extrahován v 5 ml 100% DMSO po dobu 24 hodin při 37°C. V dalším kroku se připravila zředovací destička, ve které byly připraveny logaritmické koncentrace. V tomto kroku bylo třeba maximální opatrnosti a přesnosti při pipetování, neboť např. extrakty z tablet po ochlazení na laboratorní teplotu měnily konzistenci na hustší (zřejmě díky obsahu celulózy, využívané jako pojivová látka do koncentrace max. 1%). Před přenesením do zředovací desky byly proto vzorky extraktů důkladně promíchávány pomocí vortexu a pipety. Zředěné logaritmické koncentrace bylo třeba

taktéž důkladně promíchávat dynamickým pipetováním. Po přípravě logaritmických koncentrací byla zředovací deska třepána na třepače po dobu 10 min pro zajištění co nejvyšší homogenity vzorků. Ze zředovací 96 jamkové desky bylo přeneseno vždy 2 µl do 96 jamkových desek s finálním objemem reakční směsi 200 µl, tj. logaritmické koncentrace byly finálně 100x ředěny, čímž bylo dosaženo maximální (necytotoxické) koncentrace DMSO 1 %. Finální testované koncentrace původního extraktu byly 0,0316 % - 0,1 % - 0,316 % - 1 %.

Číslo vzorku	Dávkování uvedené na obalu	Deklarovaný obsah	Deklarované složení
1	Dospělí: 4 tablety 3x denně. Děti od 3 let: 2 tablety 3 x denně.	100 tablet z koncentrovaných bylin 1:5	1g vyroben z 5g bylin: Broskvoň obecná – semeno, Děhel čínský – kořen, Světlice barvišská – květ, Achyranth dvojzubý – kořen, Rehmanie lepkavá – kořen, Pivoňka bělokvětá – červený kořen, Bigaradie – plod, Koprníček Walichův – oddenek, Platykodon velkokvětý – kořen, Lékořice – uprav. kořen.
2	Dospělí: 4 tablety 3x denně. Děti od 3 let: 2 tablety 3 x denně.	100 tablet z koncentrovaných bylin 1:5	1 g vyroben z 5 g bylin: Rehmanie lepkavá – kořen vařený ve víně, Morinda lékařská – kořen, Děhel čínský – kořen, Gumojilm jilmový – kůra kmene a větvi, Kustovnice čínská – plod, Skořicovník čínský – kůra větvi, Jam čínský – hlíza, Dřín lékařský – plod, Kokotice čínská – semena.
3	Dospělí: 4 tablety 3x denně. Děti od 3 let: 2 tablety 3 x denně.	100 tablet z koncentrovaných bylin 1:5	1 g vyroben z 5 g bylin: Světlice barvišská – květ; Broskvoň obecná – semeno; Šalvěj červenokořená – kořen; Kurkuma citvárová – oddenek; Křídlatka japonská – kořen a oddenek; Pivoňka bělokvětá – červený kořen; Toulec laločný – kořen, stonek; Zimolez japonský – stonek; Zevar výběžkatý – oddenek; Karbínec lesklý – nať; Děhel čínský – koncová část kořene.
4	Dospělí: 4 tablety 3x denně. Děti od 3 let: 2 tablety 3 x denně.	100 tablet z koncentrovaných bylin 1:5	1 g vyroben z 5 g bylin: Rehmanie lepkavá – kořen vařený ve víně; Skořicovník čínský – kůra větvi; Pomatka kokosová – plodnice houby; Pivoňka křovitá – kůra kořene; Jam čínský – hlíza; Dřín lékařský – plod; Žabník východní – oddenek.
5	Dospělí: 4 tablety 3 x denně. Děti od 3 let: 2 tablety 3 x denně.	100 tablet z koncentrovaných bylin 1:5	1 g vyroben z 5 g bylin: Pivoňka bělokvětá – kořen, Koprníček Walichův – oddenek, Žabník východní – kořen, Pomatka kokosová – plodnice houby, Bodlák velkoúborový – oddenek, Děhel čínský – kořen.
6	Dospělí: 1 odm. 2 x denně. Děti od 3 let: 1 odm. 1 x denně.	30 g prášku z koncentrovaných bylin 1:5	1 g vyroben z 5 g bylin: Housenice čínská – plodnice houby. Obsah polysacharidů v extraktu je minimálně 30 % (200 mg/g).
7	Dospělí: Doporučená denní dávka je 1 x denně 4 odměrky.	100g koncentrovaný bylinný prášek 1:5	Jam čínský (hlíza), Skořicovník čínský (kůra větvi).
8	Dospělí: 4 odměrky 1 x denně.	30 g prášku z koncentrovaných bylin 1:5	Drmek obecný – kořen, Děhel čínský – kořen, Děhel čínský – koncová část kořene.
9	Dospělí: 1 lžička (součást balení) za den.	100 % čistý extrakt; 30 g; 80 mg/g ginsenuidů.	6 letý korejský červený ženšen. Voda, všehož ženšenový.

Tabulka 5. Seznam doplňků stravy.

6.13. Stanovení prediktivních indikátorů expozice bisfenolům a ftalátům

Pro detekci vybraných chemických látek a jejich metabolitů v moči a pro stanovení potenciálních prediktivních indikátorů zvýšené expozice endokrinním disruptorům byly vybrány archivované anonymizované vzorky ranní moči, odebrané v roce 2015 v SZÚ, Centru toxikologie a zdravotní bezpečnosti, dospělým účastníkům, mužům i ženám, pracujícím v Praze. Počet vzorků byl 96. Archivované vzorky byly zvoleny s ohledem na jejich dostupnost, nutnost zajištění dostatečného množství vzorku pro všechny analýzy a shromáždění dostatečného počtu vzorků.

Analýzy byly provedeny v akreditovaných laboratořích Státního zdravotního ústavu, Centra toxikologie a zdravotní bezpečnosti na Oddělení chemické bezpečnosti (metabolity ftalátů, bisfenoly) a Centra hygieny práce a pracovního lékařství, Oddělení pro hodnocení expozice chemickým látkám na pracovišti (kreatinin).

Všechny zjištěné koncentrace analytů byly přepočítány na gram kreatininu ($\mu\text{g/g Cr}$). Byly stanoveny základní statistické ukazatele (četnost, aritmetický průměr, geometrický průměr, medián, percentil 95, 75, 50, 25 a nejvyšší hodnota). Výsledky byly vyneseny do grafů (viz grafy 14., 15., 16.) a na základě zhodnocení četnosti detekce byly stanoveny potenciální prediktivní indikátory zvýšené expozice endokrinním disruptorům. Pro základní statistické vyhodnocení, poskytující základní statistické ukazatele, byl použit program Excel 2013 (Microsoft Office Standard 2013). Výsledky byly rovněž shrnuty do přehledné tabulky, interpretovány a diskutovány na základě popisných charakteristik a základních statistických parametrů. Seznam analytů stanovovaných ze vzorků moči je uveden v tabulce 6.

Číslo analytu	Název analytu	Zkratka (Označení analytu v grafech)
1	Kreatinin	Cr
2	Monoethyl ftalát	MEP
3	Mono isobutyl ftalát	MiBP
4	Monobutyl ftalát	MnBP
5	Mono(2-ethyl-5-oxohexyl) ftalát	5-oxo-MEHP
6	Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) ftalát	5-OH-MEHP
7	Mono ethylhexyl ftalát	MEHP
8	Mono benzyl ftalát	MBzP
9	Bisfenol S	BPS
10	Bisfenol F	BPF
11	Bisfenol A	BPA

Tabulka 6. Seznam analytů stanovených v 96 vzorcích moči.

6.14. Porovnání efektivity intervenčních opatření pro potenciální snížení expozice bisfenolům a ftalátům

Studie byla navržena jako doplňková a její potenciální přínos vyplynul z řešeršní části sledující vývoj problematiky a z dosažených výsledků experimentální části disertační práce. S ohledem na omezený počet účastníků ($n = 6$) byla studie uspořádána jako dvoufázová se dvěma fázemi intervence s odlišnými stravovacími zvyklostmi (Fáze I – zvýšení expozice: požadavek na konzumaci konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách, Fáze II – snížení expozice: požadavek na vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách), kdy se všichni dobrovolníci účastnili obou fází studie. V obou fázích bylo nutné zajistit po dobu čtyř dnů v definovaných časech odběry moči a bylo též vhodné, aby se co nejvíce účastníků nacházelo v obou fázích studie co nejdéle dobu ve shodném vnitřním prostředí (domácnosti). Dle časových

možností účastníků a za účelem časového oddělení jednotlivých fází studie tak, aby výsledky jednotlivých fází nebyly vzájemně ovlivněny, bylo zvoleno dostatečně dlouhé období bez intervence (cca 4 měsíce).

Časové schéma studie:

Zařazení subjektů (10/2017) - Fáze I: zvýšení expozice (11/2017) – Období bez intervence (cca 4 měsíce) - Fáze II: snížení expozice (04/2018)

Každá fáze studie trvala 4 dny po sobě (pátek – pondělí), přičemž v pondělí došlo k odběru pouze ranní moči a doručení všech vzorků koordinátorovi studie. Účastníci odebírali celkem 10 vzorků moči dle harmonogramu uvedeného v tabulce 7:

Číslo odběru uvedené v grafech (viz odst. 7.10.)	Den a doba odběru	Druh vzorku	Čas odběru
1	pátek ráno	první ranní moč	po probuzení
2	pátek odpoledne	odpolední moč	16:00 – 17:00
3	pátek večer	poslední denní moč	21:00 – 22:00
4	sobota ráno	první ranní moč	po probuzení
5	sobota odpoledne	odpolední moč	16:00 – 17:00
6	sobota večer	poslední denní moč	21:00 – 22:00
7	neděle ráno	první ranní moč	po probuzení
8	neděle odpoledne	odpolední moč	16:00 – 17:00
9	neděle večer	poslední denní moč	21:00 – 22:00
10	pondělí ráno	první ranní moč	po probuzení

Tabulka 7. Harmonogram, čas odběru a označení odběrů moči.

Fáze I probíhala v listopadu 2017. Požadovala stravu zaměřenou na konzervované potraviny (min. 2 ks za den dle vlastního výběru), a nápoje v plechovkách, nealkoholické i alkoholické – např. pivo (min. 2 ks za den dle vlastního výběru). Fáze II probíhala v dubnu 2018. Požadovala vyloučení jakýchkoliv konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách ve stravě. V obou studiích bylo požadováno vynechání vybraných činností: zahradničení, modelářství, práce s barvami, lepidly, syntetickými tmely, laky, nátěrovými hmotami. Jako bazální (neovlivněný žádnou z fází studie) byl zvolen vždy první odběr moči. Ve vzorcích moči byly sledovány analyty uvedené v tabulce 8.

Číslo analytu	Název analytu	Zkratka
1	Kreatinin	Cr
2	Monoethyl ftalát	MEP
3	Mono isobutyl ftalát	MiBP
4	Monobutyl ftalát	MnBP
5	Mono(2-ethyl-5-oxohexyl) ftalát	5-oxo-MEHP
6	Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) ftalát	5-OH-MEHP
7	Mono ethylhexyl ftalát	MEHP
8	Mono benzyl ftalát	MBzP
9	Bisfenol S	BPS
10	Bisfenol F	BPF
11	Bisfenol A	BPA

Tabulka 8. Analyty sledované ve vzorcích moči.

Všichni dobrovolníci, jejichž vzorky a data byly studovány, potvrdili podpisem Informovaného souhlasu s účastí ve studii svoji ochotu účastnit se studie. Studie byla schválena etickou komisí Státního zdravotního ústavu v Praze.

Účastníci obdrželi odběrovou sadu pro odběr vzorků, sestávající z nitrilových rukavic, předem označených skleněných vialek se šroubovacím uzávěrem krytým TPFE septem pro odběr moči, návod na odběr a zamražení vzorků, ZIP-LOCK sáčky a polystyrenový kontejner s mrazíci vložkami pro přepravu vzorků. V rámci informovaného souhlasu obdrželi účastníci pokyny pro intervenci (konzumace min. 2 ks konzervovaných potravin a 2 ks nápojů v plechovkách ve Fázi I, vyloučení konzumace konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách ve Fázi II). Vzorky moči v předem označených vialkách účastníci uskladnili ihned po odběru do ZIP-LOCK sáčků a vložili do mrazničky do teploty -18° až -20°C . Poslední den studie v ranních hodinách byly vzorky doručeny v zamraženém stavu koordinátorovi studie a po vizuální kontrole jejich kvality byly vzorky uloženy do -20°C do dne provedení chemické analýzy.

6.15. Příprava informačního materiálu, vhodného pro předávání informací široké veřejnosti jako nástroj pro obor preventivní medicíny pro využití např. i v rámci klinické praxe.

Informační materiál, vhodný pro edukaci odborné veřejnosti a preventivní poradenství ohledně potenciálního snižování expozice ED byl připraven jako návrh v PDF tak, aby v případě zájmu např. orgánů ochrany veřejného zdraví, odborné veřejnosti, odborníků z klinické praxe (např. gynekologů, praktických lékařů, pediatrů) mohl být využitelný pro preventivní poradenství i edukaci široké veřejnosti. S ohledem na různorodost expozičních cest a rozšíření chemických látek s potenciálem interagovat s endokrinním systémem byl informační materiál připraven jako srozumitelný návod 10 rad, jak potenciálně snižovat expozici ED v běžném životě. Byl připraven návrh jak zkrácené popularizované verze, obsahující minimum textu, s cílem podnítit zájem širší veřejnosti o téma endokrinní disrupce, tak návrh upřesňujícího rozšířeného textu, vhodně názorně doplněného o grafiku, který by mohl být využit jako informativní brožura.

7. Výsledky

Dosažené výsledky jsou popsány jak v této práci, tak v publikacích, které jsou její součástí (Dvořáková et al. 2016, Dvořáková et al. 2018, Kejlová et al. 2019). V této kapitole jsou dosažené, i dosud nepublikované výsledky rekapitulovány, upřesněny a shrnuty. Interpretaci a diskusi výsledků obsahuje kapitola 8. - Diskuse.

Nejprve byla provedena predikce potenciálních ligandů estrogenového receptoru *in silico*, za využití veřejně dostupného nástroje OECD QSAR Toolbox u dvou skupin u vybraných chemických látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích (ftalátů, bisfenolů). Následně byla predikce *in silico* ověřena pomocí dvou nově zavedených *in vitro* metod, a to metodou OECD TG 455, založenou na lidské buněčné linii přirozeně exprimující estrogenový receptor α a β a v rámci dalších experimentů později i metodou YES, založenou na geneticky modifikovaném kmenu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* se stabilně inkorporovaným genem pro lidský estrogenový receptor α . Experimentální práce pokračovala stanovením potenciálu endokrinní disrupce u všech vybraných ftalátů a bisfenolů, za využití metod YES (viz výše) a metody YAS, založené na modifikovaném kmenu *S. cerevisiae* se stabilně inkorporovaným genem pro lidský androgenový receptor α . Bohužel, “Dohoda o přenosu technologií” na dobu určitou 2 let mezi University of Davis, California, USA a Státním zdravotním ústavem, zajišťující buněčnou linii pro metodu dle pokynu OECD TG 455/457, vypršela v červnu 2017 a dosud se ji nepodařilo (přes opakovanou snahu) obnovit. Ještě před vypršením dohody byla veřejně publikována na stránkách NTS (National Toxicology Program, aktivita U.S. Department of Health & Human Services - Ministerstvo zdravotnictví a sociálních služeb USA), informace, že poskytnutá buněčná linie BG1Luc4E2, uvedená v původním pokynu TG OECD 457, popisovaná jako buňky z karcinomu ovaria, byla pomocí STR analýzy identifikována jako varianta buněk MCF-7 z karcinomu prsu (<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/methods/endocrine/bg1luc/bg1luc-vm7luc-june2016-508.pdf>). Buněčná linie byla přejmenována na VM7Luc4E2 a byl též aktualizován pokyn OECD TG 457 - buňky VM7Luc4E2 byly zahrnuty do pokynu OECD TG 455 s tím závěrem, že v případě testování endokrinního potenciálu nemá výsledek STR analýzy vliv na interpretaci výsledků, neboť exprese genů pro lidský estrogenový receptor je v buněčné linii VM7Luc4E2 dostatečně prokázána, má být tudíž pro testování endokrinního potenciálu nadále využívána. Metody YES a YAS se mezitím při práci s vybranými chemickými látkami osvědčily jako vhodné pro rutinní testování, proto byly zvoleny pro optimalizaci k širšímu využití, resp. testování endokrinního potenciálu spotřebních výrobků. Experimentální práce dále pokračovala testováním extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru, plastu, kosmetických přípravků různého složení a doplňků stravy s využitím metod YES, YAS. Byla rovněž sledována související legislativa a vědecký vývoj. Důležitým aspektem komplexního sledování endokrinní disrupce jako systémového typu toxicity není pouze stanovení (ne)bezpečnosti chemických látek či spotřebních výrobků, ale také sledování cest expozice a biologické monitorování. Experimentální práce pokračovala analýzou 96 archivovaných vzorků moči s cílem ověřit předpokládané prediktivní indikátory expozice ftalátům a bisfenolům. Z odborných zdrojů bylo zjištěno, že minimum prací je zaměřeno na sledování efektivity intervenčních opatření potenciálně snižujících expozici. Proto experimentální práce pokračovala doplňkovou studií na omezeném souboru dobrovolníků, sledující potenciální snížení expozice ftalátům a bisfenolům po vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách.

Na základě všech dosažených výsledků i informací z odborných zdrojů byl připraven informační materiál, vhodný pro předávání informací široké veřejnosti jako nástroj pro obor preventivní medicíny pro využití např. i v rámci klinické praxe.

7.1. Predikce potenciálních ligandů estrogenového receptoru *in silico*

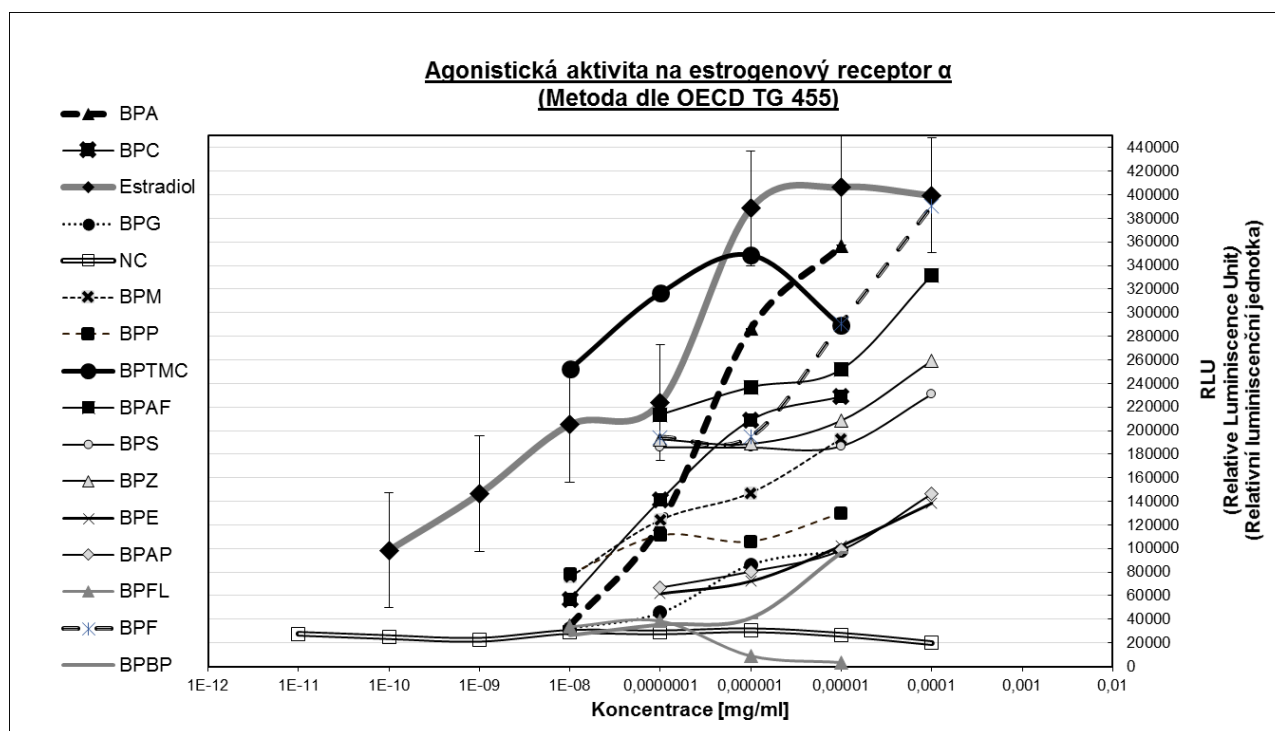
Všechny látky ze skupiny bisfenolů byly pomocí *in silico* nástroje OECD QSAR Toolbox predikovány jako velmi silné ligandy estrogenového receptoru (“very strong binder”). Všechny látky ze skupiny ftalátů, které byly predikovány jako nevážající se na estrogenový receptor (“non binder”). Výsledky jsou sumarizovány v tabulce 9.

Č.	Látka	Zkratka	CAS	MW	Sumární vzorec	Vazba na ER (QSAR)
1	Bisfenol A	BPA	80-05-7	228.29	(CH ₃) ₂ C(C ₆ H ₄ OH) ₂	Velmi silný ligand
2	Bisfenol AF	BPAF	1478-61-1	336.23	(CF ₃) ₂ C(C ₆ H ₄ OH) ₂	Velmi silný ligand
3	Bisfenol AP	BPAP	1571-75-1	290.36	CH ₃ C(C ₆ H ₅)(C ₆ H ₄ OH) ₂	Velmi silný ligand
4	Bisfenol BP	BPBP	1844-01-5	352.43	C ₂₅ H ₂₀ O ₂	Velmi silný ligand
5	Bisfenol C	BPC	79-97-0	256.34	(CH ₃) ₂ C[C ₆ H ₃ (CH ₃)OH] ₂	Velmi silný ligand
6	Bisfenol E	BPE	2081-08-5	214.26	CH ₃ CH(C ₆ H ₄ OH) ₂	Velmi silný ligand
7	Bisfenol F	BPF	620-92-8	200.23	CH ₂ (C ₆ H ₄ OH) ₂	Velmi silný ligand
8	Bisfenol FL	BPFL	3236-71-3	350.41	C ₂₅ H ₁₈ O ₂	Velmi silný ligand
9	Bisfenol G	BPG	127-54-8	312.45	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	Velmi silný ligand
10	Bisfenol M	BPM	13595-25-0	346.46	C ₆ H ₄ [C(CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ OH] ₂	Velmi silný ligand
11	Bisfenol P	BPP	2167-51-3	346.46	C ₆ H ₄ [C(CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ OH] ₂	Velmi silný ligand
12	Bisfenol S	BPS	80-09-1	250.27	O ₂ S(C ₆ H ₄ OH) ₂	Velmi silný ligand
13	Bisfenol TMC	BPTMC	129188-99-4	310.43	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	Velmi silný ligand
14	Bisfenol Z	BPZ	843-55-0	268.35	C ₆ H ₁₀ (C ₆ H ₄ OH) ₂	Velmi silný ligand
15	Diethyl ftalát	DEP	84-66-2	222,24	C ₆ H ₄ -1,2-(CO ₂ C ₂ H ₅) ₂	Není ligand
16	Bis(2-ethylhexyl) ftalát	DEHP	117-81-7	390,56	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Není ligand
17	Benzyl butyl ftalát	BBP	85-68-7	312,36	2-[CH ₃ (CH ₂) ₃ O ₂ C]	Není ligand
18	Dibutyl ftalát	DBP	84-74-2	278,34	C ₆ H ₄ CO ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	Není ligand
19	Diisobutyl ftalát	DIBP	84-69-5	278,34	C ₆ H ₄ -1,2-[CO ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃] ₂	Není ligand
20	Diisononyl ftalát	DINP	28553-12-0	418,61	C ₆ H ₄ -1,2-[CO ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂] ₂	Není ligand
21	Diisodecyl ftalát	DIDP	26761-40-0	446,66	C ₆ H ₄ (CO ₂ C ₉ H ₁₉) ₂	Není ligand

Tabulka 9. Výsledky predikce estrogenní aktivity pomocí OECD QSAR Toolbox.

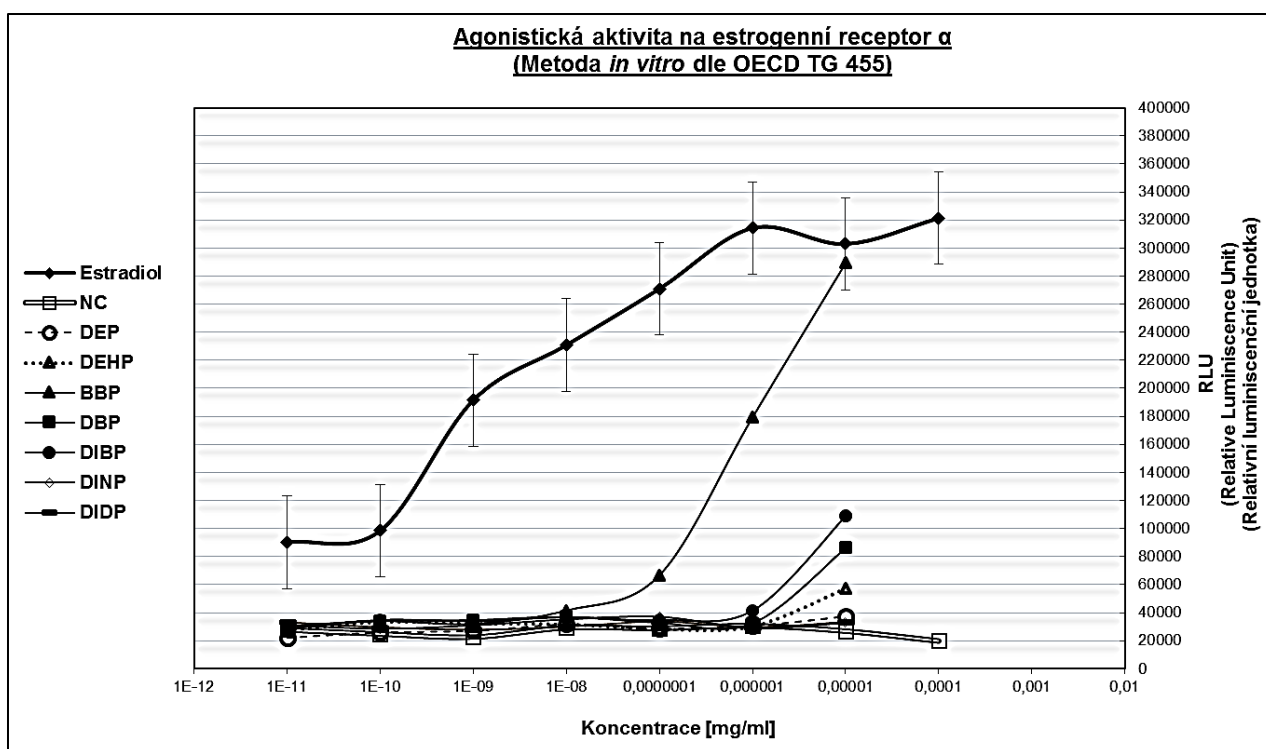
7.2. Verifikace *in silico* predikce metodou *in vitro* (OECD TG 455)

Všechny látky typu bisfenolů s výjimkou bisfenolu FL (BPFL) vykazovaly agonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α , s rozdílnou indukcí reportérového genu (viz graf 1). Nejsilnější indukce reportérového genu vedoucí k luciferázové aktivitě byla zjištěna u bisfenolu A (BPA), bisfenolu TMC (BPTMC), bisfenolu AF (BPAF) a bisfenolu F (BPF); středně silná u bisfenolu AP (BPAP), bisfenolu C (BPC), bisfenolu E (BPE), bisfenolu M (BPM), bisfenolu S (BPS) a bisfenolu Z (BPZ) a nízká u bisfenolu BP (BPBP), bisfenolu G (BPG), bisfenolu P (BPP). Negativní aktivita byla zjištěna pouze u bisfenolu FL (BPFL). Z grafu vyplývá, že některé bisfenoly (např. BPA, BPC, BPP, BPTMC) mohou fungovat jako ligandy estrogenového receptoru ve velmi nízkých koncentracích (od 10^{-8} mg/ml).



Graf 1. Agonistická aktivita na estrogenový receptor α u látek ze skupiny bisfenolů vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (17 β -estradiol).

Látky typu ftalátů, a to bis(2-ethylhexyl) ftalát (DEHP), benzyl butyl ftalát (BBP), dibutyl ftalát (DBP), diisobutyl ftalát (DIBP) vykazovaly agonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α , s rozdílnou silou indukce reportérového genu. (viz graf 2). Nejsilnější indukce reportérového genu vedoucí k luciferázové aktivitě byla zjištěna u benzyl butyl ftalátu (BBP). Nízká indukce, dosahující však hodnot luciferázové aktivity indukované pozitivní kontrolou, byla zjištěna u diisobutyl ftalátu (DIBP) a dibutyl ftalátu (DBP). Velmi nízká až negativní aktivita byla zjištěna u diethyl hexyl ftalátu (DEHP). Z grafu vyplývá, že benzyl butyl ftalát může fungovat jako ligand estrogenového receptoru (tj. indukuje transkripci reportérového genu, která vede k luciferázové aktivitě) v nízké koncentraci (10^{-7} mg/ml). Ostatní ftaláty indukovaly transkripci reportérového genu v koncentraci 10^{-5} mg/ml.



Graf 2. Agonistická aktivita na estrogenový receptor α u látek ze skupiny ftalátů vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (17 β -estradiol).

7.3. Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích

Pro stanovení potenciálu endokrinní disrupce u vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích, byly využity metody (*in silico*, *in vitro*), popsané v části 6. Metodika. Dosažené výsledky byly publikovány v odborných člancích (Dvořáková et al. 2016, Dvořáková et al. 2018). V této části práce jsou výsledky dosažené všemi metodami zpřesněny a rekapitulovány v tabulce 10.

Kromě agonistické aktivity vůči estrogenovému receptoru zjištěné metodou dle OECD TG 455 (viz bod 7.2.), kdy u všech bisfenolů s výjimkou bisfenolu FL (BPFL) byla zjištěna různě silná schopnost indukovat transkripci reportérového genu, vedoucí k luciferázové aktivitě, byla u bisfenolů pomocí metody YES tato estrogení aktivita potvrzena s výjimkou bisfenolu BP (BPBP), který při testování metodou YES nevykazoval pozitivní odpověď. Slabá agonistická aktivita vůči androgenovému receptoru byla zjištěna pomocí metody YAS u bisfenolu FL (BPFL) a bisfenolu Z (BPZ). Pomocí metod anti YES, YAS, anti YAS byla dále pozorována střední až slabá antagonistická aktivita vůči estrogenovému receptoru. U všech bisfenolů byla zjištěna slabá, střední až silná antagonistická aktivita vůči androgenovému receptoru (viz tabulka 10.).

U látek ze skupiny ftalátů byla pomocí metody YES potvrzena estrogení aktivita u benzyl butyl ftalátu (BBP). V metodě anti YES vykazoval antiestrogení aktivitu dibutyl ftalát (DBP). Pomocí metody anti YAS byla u ftalátů DEHP, BBP, DBP, DIBP zjištěna slabá antagonistická aktivita vůči androgenovému receptoru (AR). Žádná látka ze skupiny ftalátů nevykazovala agonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru.

Testovaná látka	Ligand ER (OECD QSAR Toolbox)	Agonista ER α , ER β (OECD TG 455)	Agonista ER α (YES)	Antagonista ER α (anti YES)	Agonista AR (YAS)	Antagonista AR (anti YAS)
Diethyl ftalát (DEP)	N	N	N	N	N	N
Bis(2-ethylhexyl) ftalát (DEHP)	N	N	N	N	N	+
Benzyl butyl ftalát (BBP)	N	+++	++	N	N	+
Dibutyl ftalát (DBP)	N	+	N	++	N	+
Diisobutyl ftalát (DIBP)	N	+	N	N	N	+
Diisononyl ftalát (DINP)	N	N	N	N	N	N
Diisodecyl ftalát (DIDP)	N	N	N	N	N	N
Bisfenol A (BPA)	+++	+++	+++	+	N	++
Bisfenol AF (BPAF)	+++	+++	+++	+	N	+
Bisfenol AP (BPAP)	+++	++	+	++	N	+
Bisfenol BP (BPBP)	+++	+	N	+	N	++
Bisfenol C (BPC)	+++	++	+++	N	N	+++
Bisfenol E (BPE)	+++	++	+	N	N	+
Bisfenol F (BPF)	+++	+++	++	+	N	+
Bisfenol FL (BPFL)*	+++	N	+	+	+	+
Bisfenol G (BPG)*	+++	+	++	+	N	++
Bisfenol M (BPM)*	+++	++	+	+	N	+++
Bisfenol P (BPP)	+++	+	+	++	N	++
Bisfenol S (BPS)	+++	++	++	+	N	++
Bisfenol TMC (BPTMC)*	+++	+++	+++	N	N	++
Bisfenol Z (BPZ)	+++	++	+++	N	+	N

Tabulka 10. Potenciál endokrinní disrupce látek ze skupiny bisfenolů a ftalátů kategorizovaný podle síly odezvy, identifikované dle závislosti hodnot RLU (relativní světelné jednotky) a OD₅₇₀ (optické density měřené jako redukce rozptylu světla při 570 nm) na koncentraci.

Legenda k tabulce 10:

*Testováno v nejvyšší možné necytotoxické testované koncentraci: 10^{-5} mol/l (u metody založené na *S. cerevisiae*)

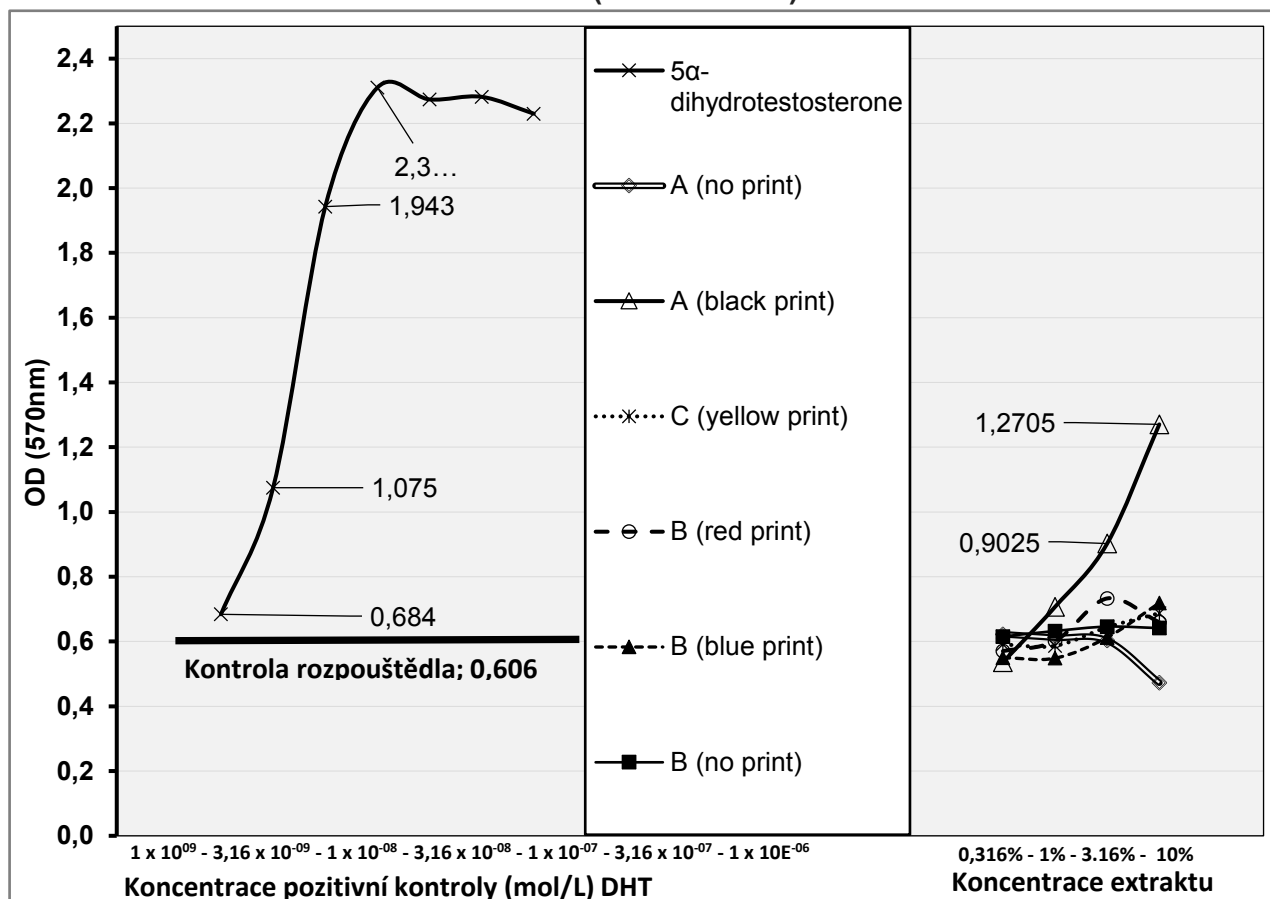
Kategorizace výsledků (+, ++, +++) byla zvolena jen pro upřesnění výsledků v této práci.

- +++ výsledek OECD QSAR Toolbox označuje velmi silný ligand, výsledek N označuje, že látka není predikována jako ligand příslušného receptoru.
- +++ výsledek *in vitro* metod (OECD TG 455, YES a YAS) označuje, že testovaná látka vykazovala nejsilnější pozitivní odpověď, indikující agonistickou nebo antagonistickou aktivitu vůči příslušnému receptoru (ER – estrogenovému receptoru, AR – androgenovému receptoru). Tato pozitivní odpověď byla identifikována především křivkou závislosti odezvy na koncentraci, kdy křivka obsahovala minimálně dva body (průměr \pm SD), přičemž hodnota (RLU – relativní světelná jednotka pro metodu OECD TG 455, OD₅₇₀ – optická densita měřená jako redukce rozptylu světla při vlnové délce 570 nm pro metody YES, YAS) zjištěná u nejvyšší koncentrace testované látky dosahovala alespoň 60 % hodnoty zjištěné u nejvyšší testované koncentrace pozitivní kontroly.
- ++ výsledek *in vitro* metod (OECD TG 455, YES a YAS) označuje, že testovaná látka vykazovala střední pozitivní odpověď, indikující agonistickou nebo antagonistickou aktivitu vůči příslušnému receptoru (ER – estrogenovému receptoru, AR – androgenovému receptoru). Tato pozitivní odpověď byla identifikována především křivkou závislosti odezvy na koncentraci, kdy křivka obsahovala minimálně dva body (průměr \pm SD), přičemž hodnota (RLU – relativní světelná jednotka pro metodu OECD TG 455, OD₅₇₀ – optická densita měřená jako redukce rozptylu světla při vlnové délce 570 nm pro metody YES, YAS) zjištěná u nejvyšší testované koncentrace látky dosahovala alespoň 30 % hodnoty zjištěné u nejvyšší testované koncentrace pozitivní kontroly.
- + výsledek *in vitro* metod (OECD TG 455, YES a YAS) označuje, že testovaná látka vykazovala slabou pozitivní odpověď, indikující agonistickou nebo antagonistickou aktivitu vůči příslušnému receptoru (ER – estrogenovému receptoru, AR – androgenovému receptoru). Tato pozitivní odpověď byla identifikována nejvyšší hodnotou (RLU – relativní světelná jednotka pro metodu OECD TG 455, OD₅₇₀ – optická densita měřená jako redukce rozptylu světla při vlnové délce 570 nm pro metody YES, YAS) zjištěnou u testované látky, která dosahovala alespoň 10 % hodnoty zjištěné u nejvyšší testované koncentrace pozitivní kontroly.
- N výsledek u *in vitro* metod označuje negativní odezvu, identifikovanou nejvyšší hodnotou (RLU – relativní světelná jednotka pro metodu OECD TG 455, OD₅₇₀ – redukce rozptylu světla při vlnové délce 570 nm pro metody YES, YAS) dosahující u testované látky méně než 10 % z hodnoty nejvyšší testované koncentrace pozitivní kontroly.
- Konfluence buněk zjištěná při mikroskopické kontrole po inkubaci nesmí klesnout pod 60 % (pro metodu OECD TG 455). Viabilita buněk zjištěná při spektrofotometrické kontrole po inkubaci měřená jako redukce rozptylu světla při vlnové délce 690 nm musela vždy vykazovat hodnoty OD₆₉₀ (absorbance měřená při 690 nm) vyšší než 0,5 u všech hodnocených koncentrací.

7.4. Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru

Za použití metod uvedených v bodech 6.3. až 6.6. vykazovaly vzorky s bílým, žlutým, červeným a modrým potiskem negativní agonistickou aktivitu vůči estrogenovému i androgenovému receptoru. Vzorek papíru s černým potiskem A (black print) vykazoval agonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru (AR) (viz graf 3).

Agonistická aktivita vůči androgenovému receptoru (Metoda YAS)



Graf 3. Agonistická aktivita extraktu spotřebního výrobku na bázi papíru vůči androgenovému receptoru, vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (5 α -dihydrotestosteron (DHT)).

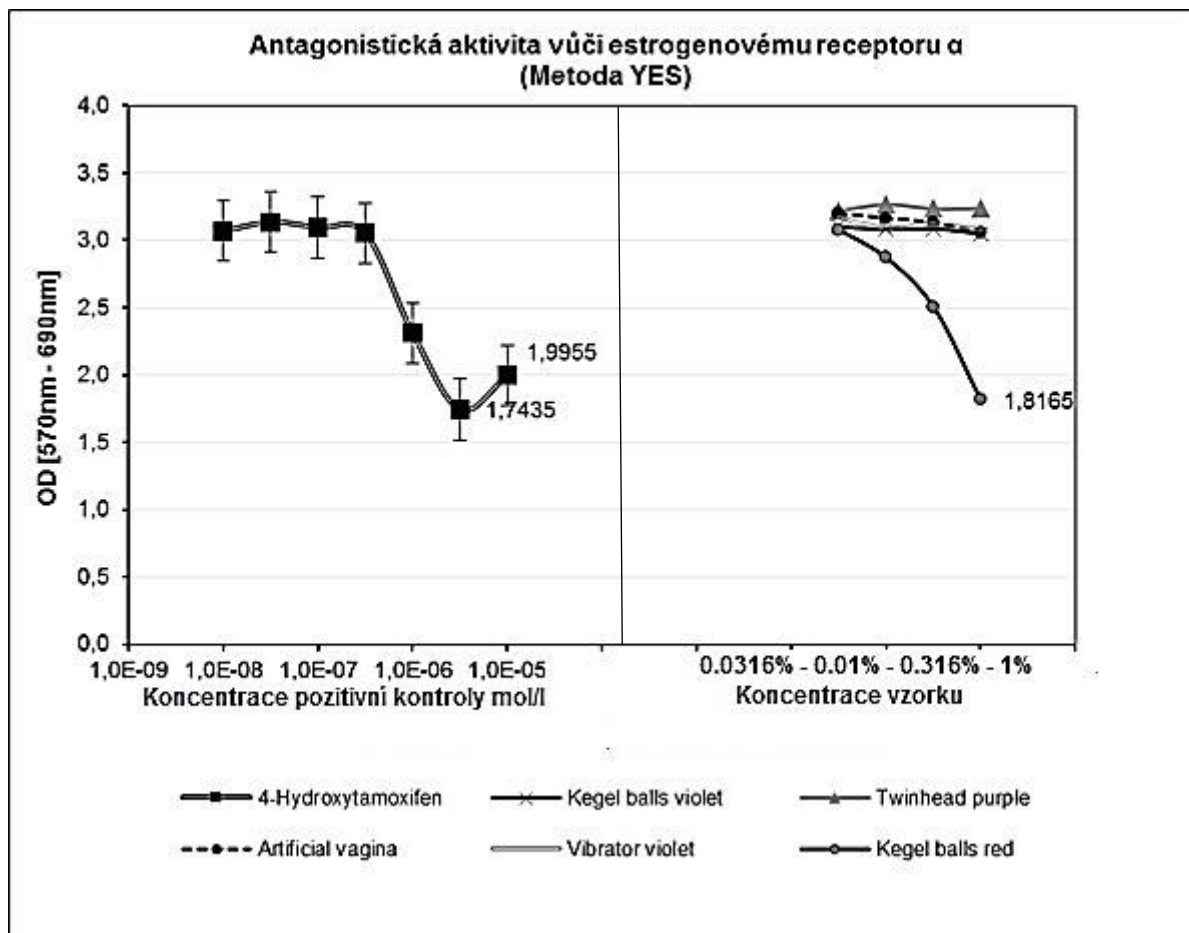
V antagonistických studiích (anti YES, anti YAS) bylo zjištěno zvýšení hodnot OD₅₇₀ a vyšší indukční poměr (tučně zvýrazněno v tabulce 11), indikující možné potencující účinky vzorku vedoucí k zesílení vazby silných ligandů (standardního přídatku v definované koncentraci; viz odst. 6.4. a 6.5.) na příslušný receptor, ve srovnání s hodnotami negativní kontroly. Indukční poměry negativní kontroly (1% DMSO), pozitivní kontroly v definovaných koncentracích (mol/l) a extraktů jsou uvedeny v tabulce 11, přičemž zvýšené hodnoty jsou označeny tučným písmem. Šedým podbarvením jsou označeny výsledky zjištěné u vzorku papíru s černým potiskem A (black print), indikující jak agonistickou, tak antagonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru.

YES – agonistická aktivita (ER - estrogenový receptor)				
Indukční poměr				
1% DMSO (kontrola rozpouštědla)	0.634	0.635	0.751	0.861
17-β estradiol [mol/L] (pozitivní kontrola)	3.16 x 10⁻¹⁰	1 x 10⁻⁹	3.16 x 10⁻⁹	1 x 10⁻⁸
	4.091	4.455	4.944	5.099
Extrakty	0.316 %	1 %	3.16 %	10 %
A (no print)	0.682	0.635	0.632	0.617
A (black print)	0.613	0.640	0.693	0,742
B (red print)	0.671	0.608	0.766	0.810
B (blue print)	0.563	0.600	0.542	0.870
B (no print)	0.636	0.625	0.600	0.602
C (yellow print)	0.577	0.665	0.648	0.697
YES – antagonistická aktivita (ER – estrogenový receptor)				
Indukční poměr				
1% DMSO (kontrola rozpouštědla)	5.758	5.377	5.644	4.831
4-Hydroxytamoxifen [mol/L] (pozitivní kontrola)	3.16 x 10⁻⁷	10⁻⁶	3.16 x 10⁻⁶	10⁻⁵
	2.530	1.611	1.437	1.504
Extracts	0.316 %	1 %	3.16 %	10 %
A (no print)	4.651	4.612	4.762	4.150
A (black print)	4.851	4.729	5.333	5.272
B (red print)	3.797	4.506	5.973	8.141
B (blue print)	3.782	4.679	4.728	7.270
B (no print)	4.271	4.537	4.500	4.399
C (yellow print)	4.525	4.078	4.519	6.083
YAS – agonistická aktivita (AR – androgenový receptor)				
Indukční poměr				
1% DMSO (kontrola rozpouštědla)	0,993	0,997	0,940	0,894
5α-dihydrotestosteron [mol/L] (pozitivní kontrola)	3.16 x 10⁻⁸	10⁻⁷	3.16 x 10⁻⁷	10⁻⁶
	3.857	3.665	3.316	3.119
Extracts	0.316 %	1 %	3.16 %	10 %
A (no print)	1.018	0.997	0.940	0.894
A (black print)	0.771	1.071	1.454	2.219
B (red print)	0.679	0.888	1.270	1.166
B (blue print)	0.760	0.778	0.912	1.354
B (no print)	1.077	1.021	0.990	0.966
C (yellow print)	0.760	0.778	0.909	1.301
YAS – antagonistická aktivita (AR – androgenový receptor)				
Indukční poměr				
1% DMSO (kontrola rozpouštědla)	3.825	3.765	3.810	3.456
Flutamide [mol/L] (pozitivní kontrola)	3.16 x 10⁻⁶	10⁻⁵	3.16 x 10⁻⁵	10⁻⁴
	2.535	1.694	0.935	0.755
Extracts	0.316 %	1 %	3.16 %	10 %
A (no print)	3.825	3.765	3.810	3.456
A (black print)	3.794	2.914	2.698	2.340
B (red print)	2.436	2.917	4.518	3.677
B (blue print)	2.520	2.676	3.188	4.606
B (no print)	3.458	3.379	3.174	3.231
C (yellow print)	2.563	2.240	3.230	4.519

Tabulka 11. Potenciál endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru identifikovaný na základě indukčního poměru (vypočteného jako 1/růstový faktor x čistá absorbance OD₅₇₀ – OD₆₉₀ / čistá absorbance kontroly rozpouštědla při 570 nm – 690 nm).

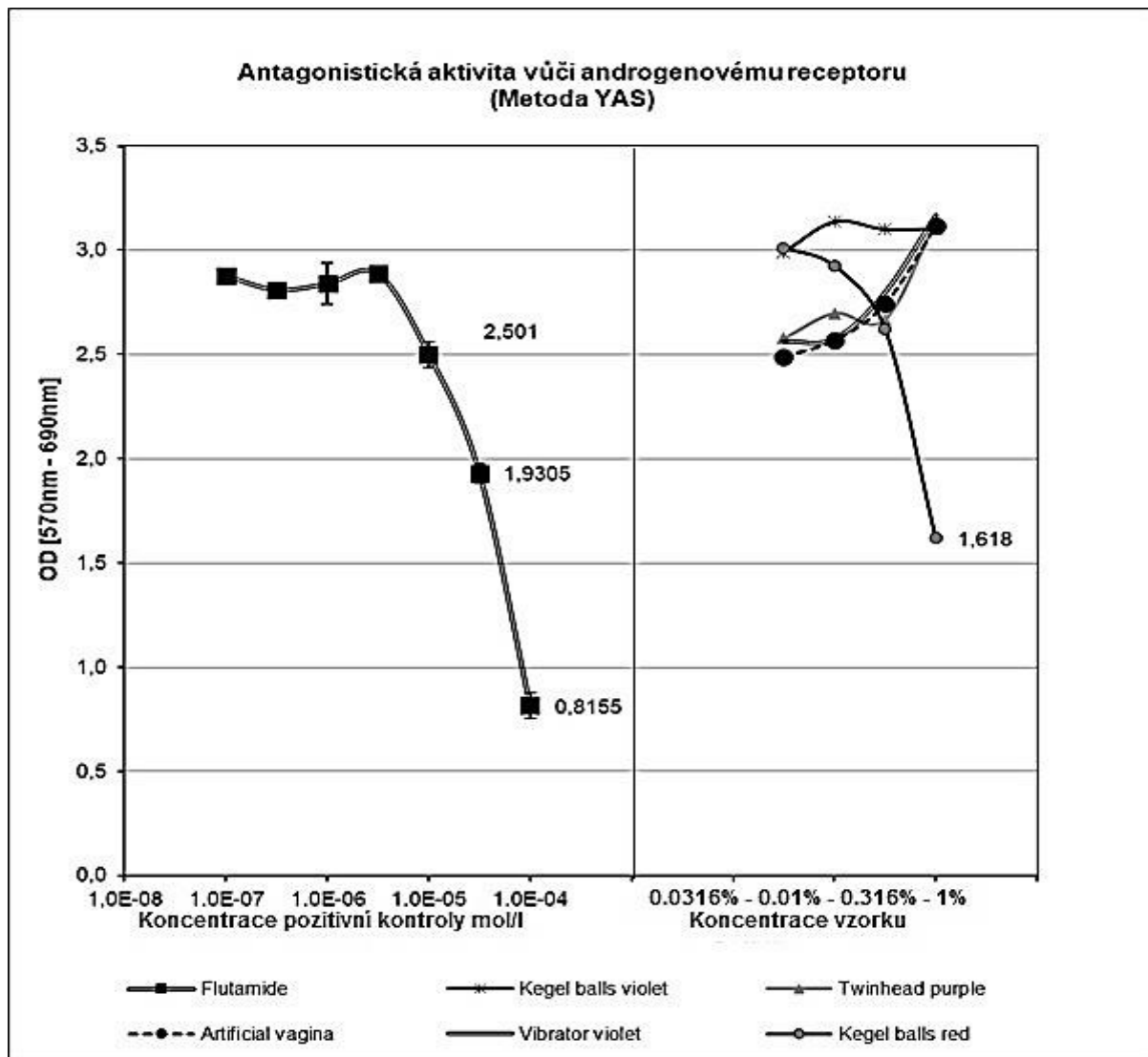
7.5. Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi plastu

Za použití metod uvedených v bodech 6.3. až 6.6. vykazoval vzorek vyrobený z plastu ABS červené barvy (“Kegel balls red”; Venušiny kuličky - červená) antagonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α . V grafu 4. je prezentována sada vzorků, ve které byl identifikován pozitivní vzorek (“Kegel balls red”, Venušiny kuličky – červená). Ostatní vzorky vykazovaly negativní odpověď.



Graf 4. Antagonistická aktivita extraktu spotřebního výrobku na bázi plastu vůči estrogenovému receptoru α , vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (4-Hydroxytamoxifen).

Za použití metod uvedených v bodech 6.3. až 6.6. vykazoval vzorek vyrobený z plastu ABS červené barvy (“Kegel balls red”; Venušiny kuličky - červená) antagonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru. V grafu 5. je prezentována sada vzorků, ve které byl identifikován pozitivní vzorek (“Kegel balls red”, Venušiny kuličky – červená). Ostatní vzorky vykazovaly velmi slabou nebo negativní odpověď.



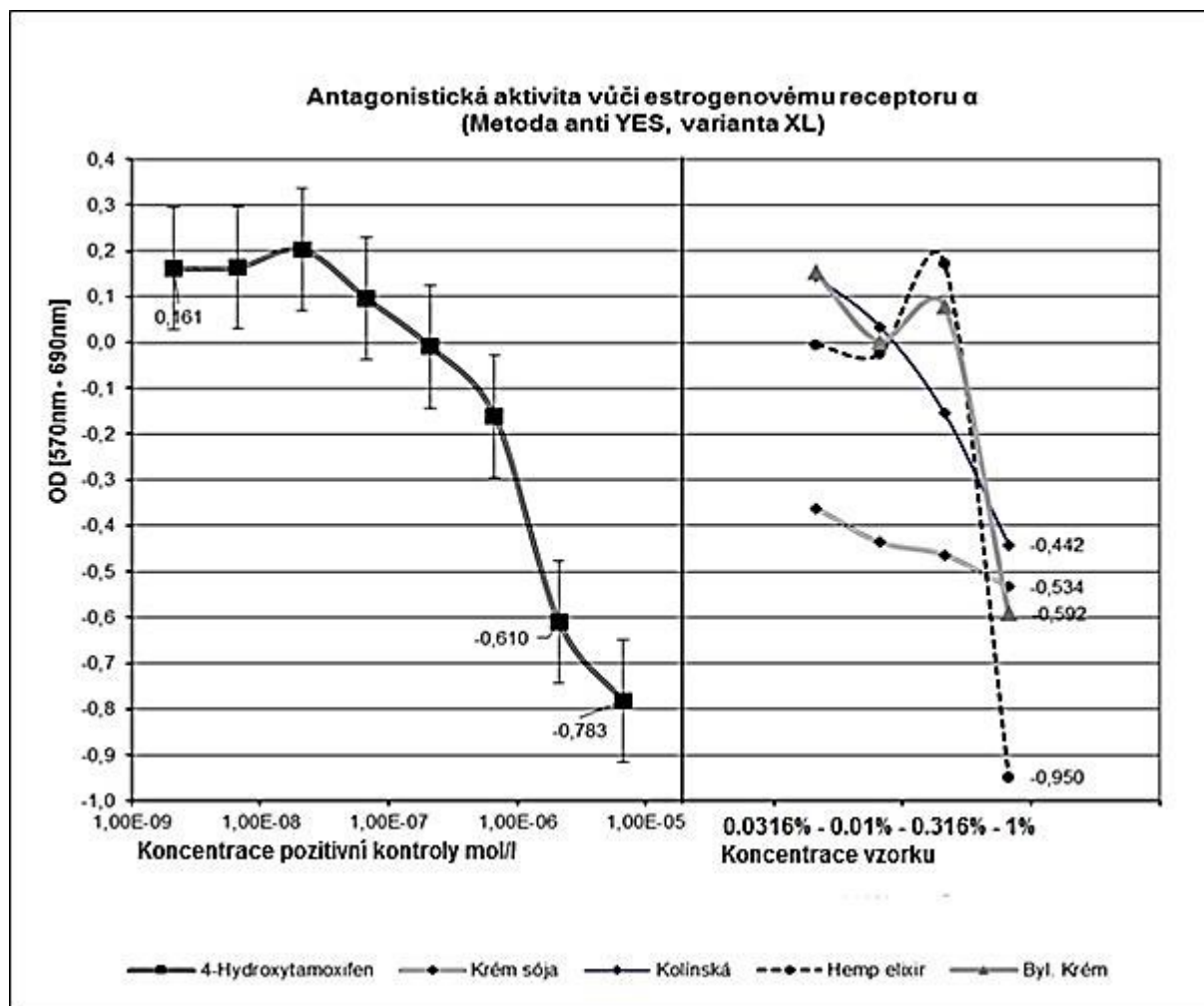
V tabulce 12. jsou shrnuty výsledky experimentů se spotřebními výrobky na bázi plastu. Výrobky, u nichž byl zjištěn jako materiál čistý 100% silikon vykazovaly negativní odpověď ve všech zkouškách. Vzorek “Kegel balls red”; Venušiny kuličky – červená vykazoval antagonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α i androgenovému receptoru.

Číslo vzorku	Označení vzorku v grafu	Typ výrobku	Výsledek	Typ plastu
1	Kegel balls blue 1	Venušiny kuličky modrá	Negativní	čistý 100% silikon
2	Kegel balls violet 1	Venušiny kuličky růžová	Negativní	čistý 100% silikon
3	Kegel balls red 1	Venušiny kuličky purpurová	Negativní	čistý 100% silikon
4	Venus balls purple 1	Venušiny kuličky fuchsiová	Negativní	čistý 100% silikon
5	Vibrator violet 1	Vibrátor dvojitý purpurový	Negativní	čistý 100% silikon + ABS
6	Twinhead purple	Vibrátor fuchsiová	Negativní	čistý 100% silikon
7	Artificial vagina	Umělá vagina	Negativní	termoplastický kaučuk
8	Vibrator violet	Vibrátor fialová	Negativní	elastomer na bázi styrenu
9	Kegel balls red	Venušiny kuličky červená	Pozitivní (antagonista ER α , antagonist AR)	ABS
10	Kegel balls violet	Venušiny kuličky fialová	Negativní	polyester tereftalát, ABS

Tabulka 12. Potenciál endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi plastu – shrnutí.

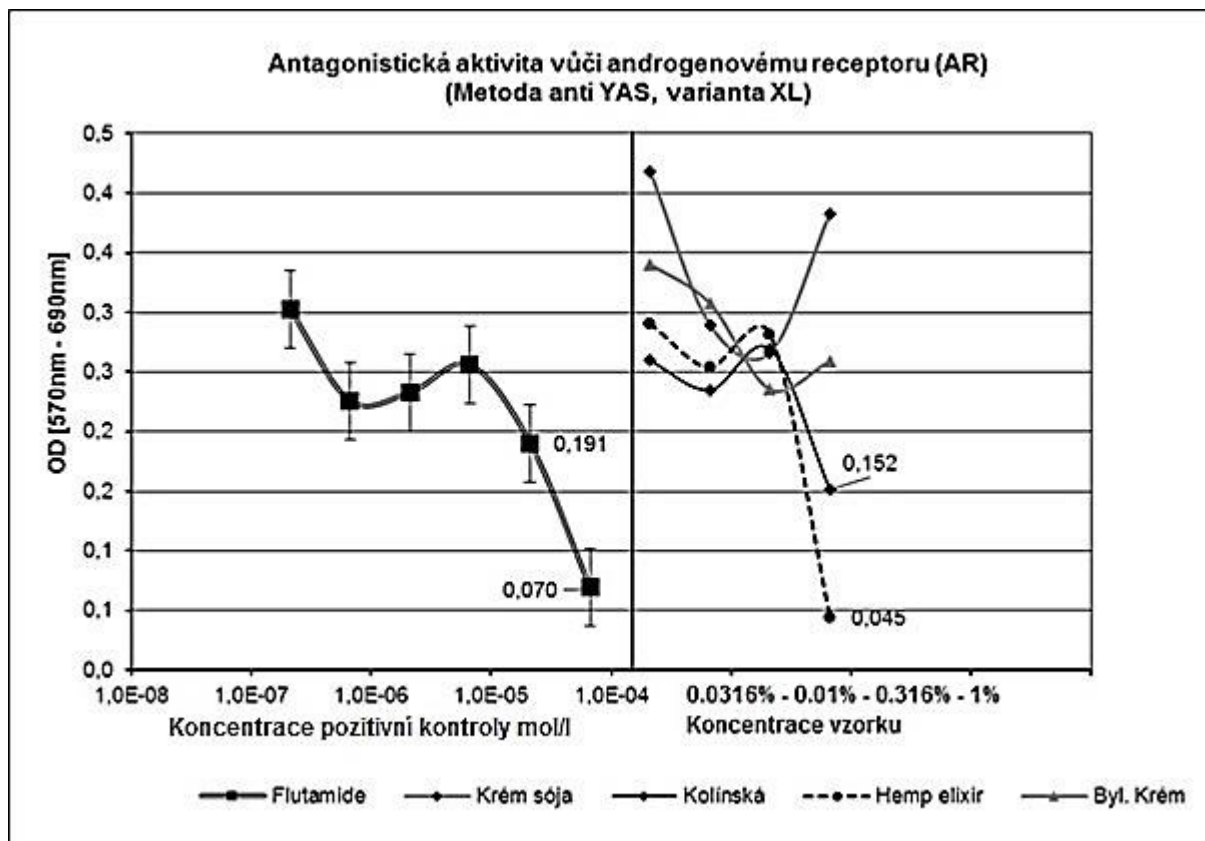
7.6. Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u kosmetických přípravků různého složení

Vzorky kosmetických přípravků různého složení antagonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α . V grafu 6. je prezentována sada vzorků, ve které byly identifikovány pozitivní vzorky.



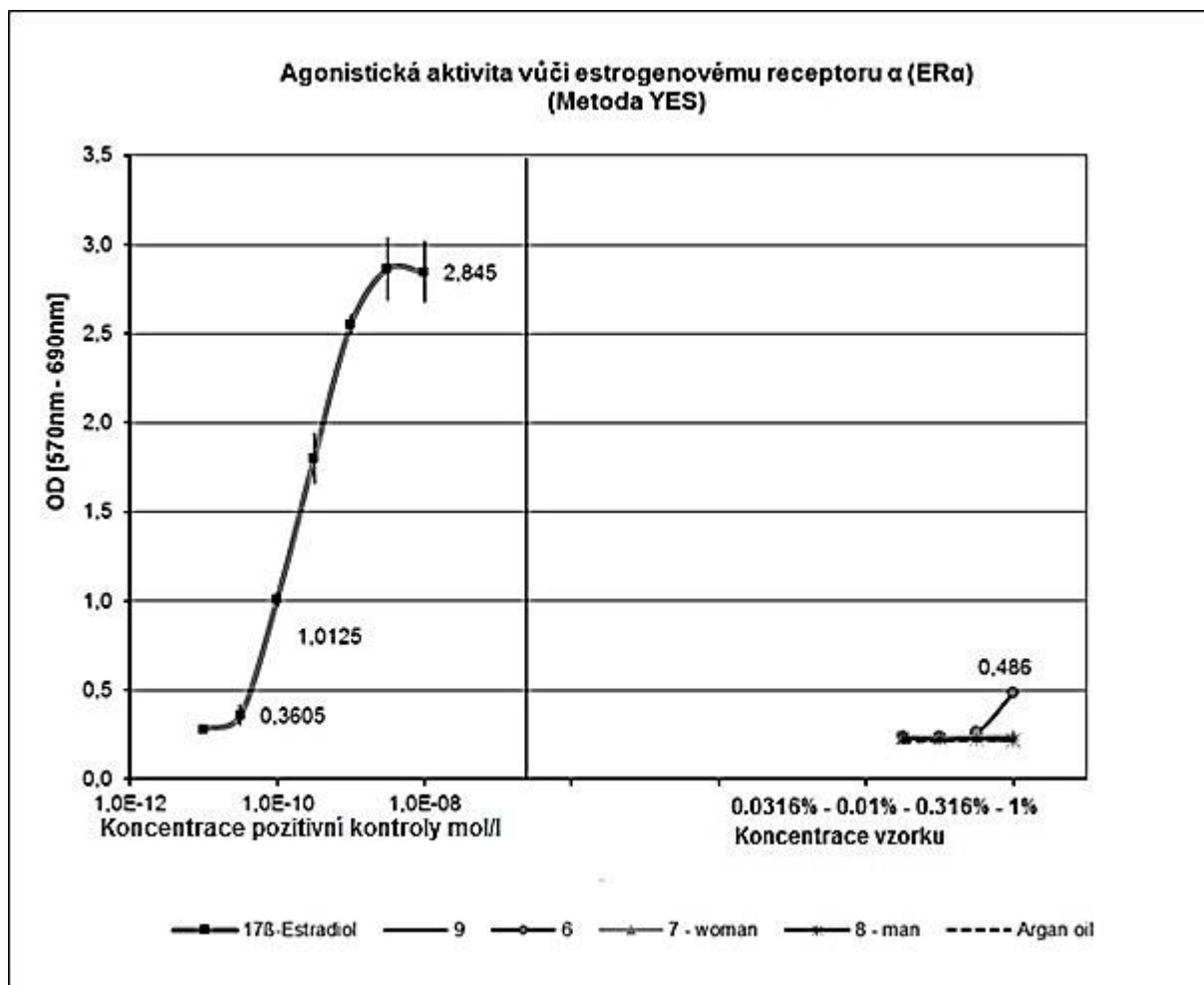
Graf 6. Antagonistická aktivita extraktů kosmetických přípravků vůči estrogenovému receptoru α , vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (4-Hydroxytamoxifen).

Vzorky kosmetických přípravků různého složení vykazovaly antagonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru. V grafu 7. je prezentována sada vzorků, ve které byly identifikovány pozitivní vzorky (“Kolínská”, “Hemp elixír”, Byl. Krém”).



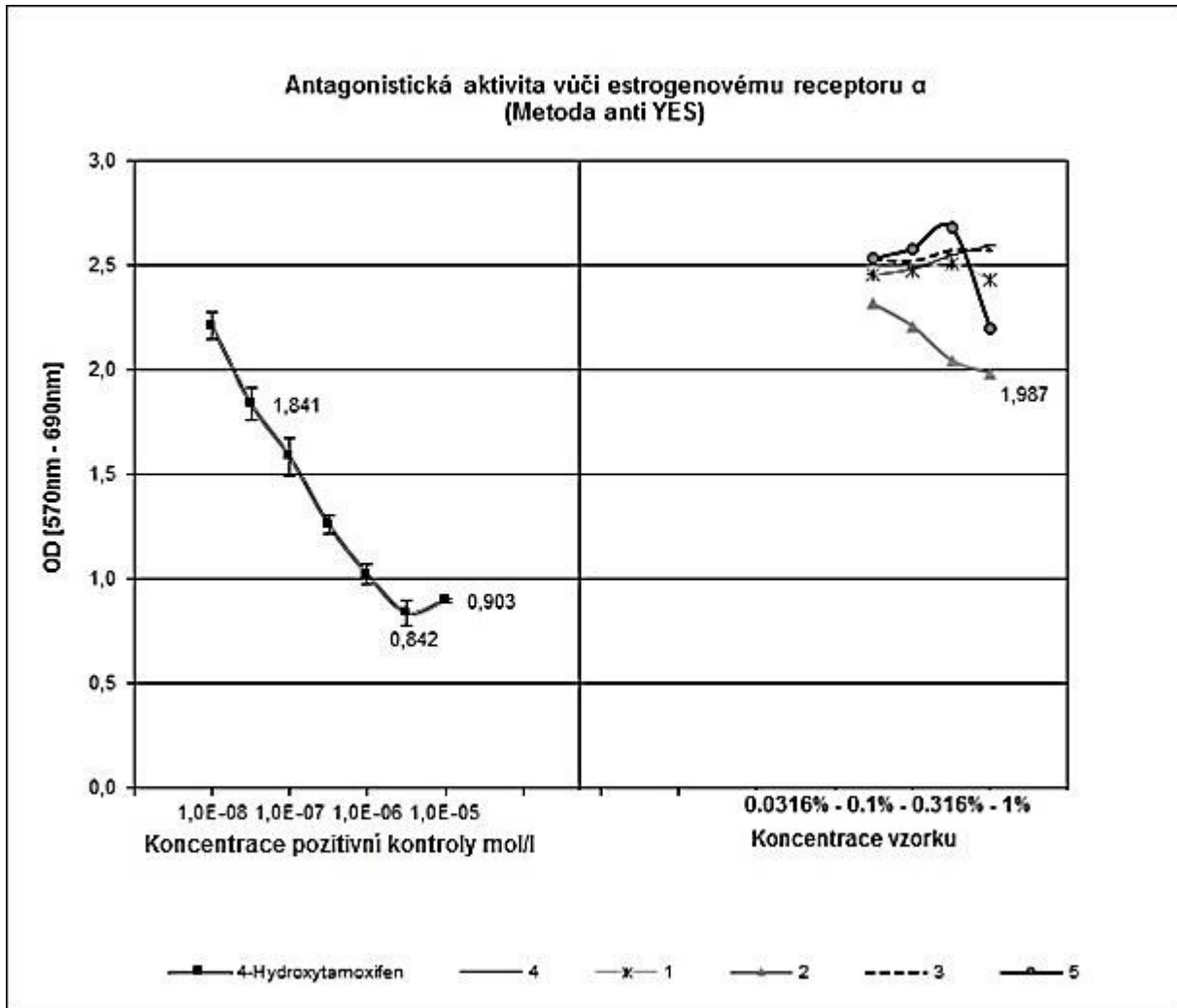
Graf 7. Antagonistická aktivita extraktů kosmetických přípravků (Kolínská, Hemp elixír, Byl. krém) vůči androgenovému receptoru v nejvyšší testované koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (Flutamid).

Vzorky kosmetických přípravků různého složení obvykle nevykazovaly agonistickou aktivitu. Slabá agonistická aktivita v jedné koncentraci byla zjištěna u vzorku 6 (parfémovaná voda) vůči estrogenovému receptoru α (viz graf 8.).



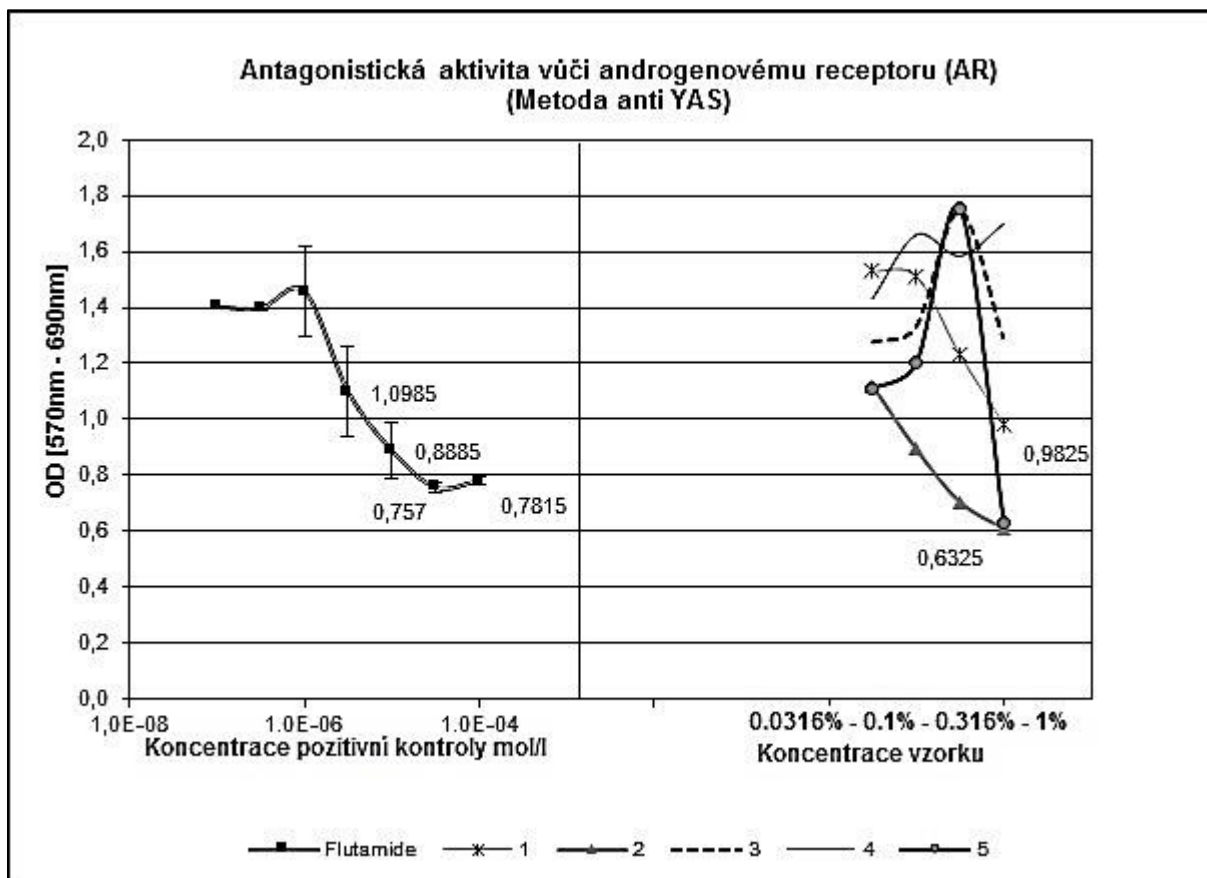
Graf 8. Slabá agonistická aktivita u nejvyšší testované koncentrace kosmetického přípravku (parfémované vody, vzorek č. 6) vůči estrogenovému receptoru α , vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (17 β -estradiol).

Vzorky kosmetických přípravků typu parfémů, deodorantů a parfémovaných vod vykazovaly v některých případech antagonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α . V grafu 9. je prezentována sada vzorků, ve které byla identifikována antagonistická odpověď vzorku 2 (parfémované vody) a pánského deodorantu (vzorek č. 5).



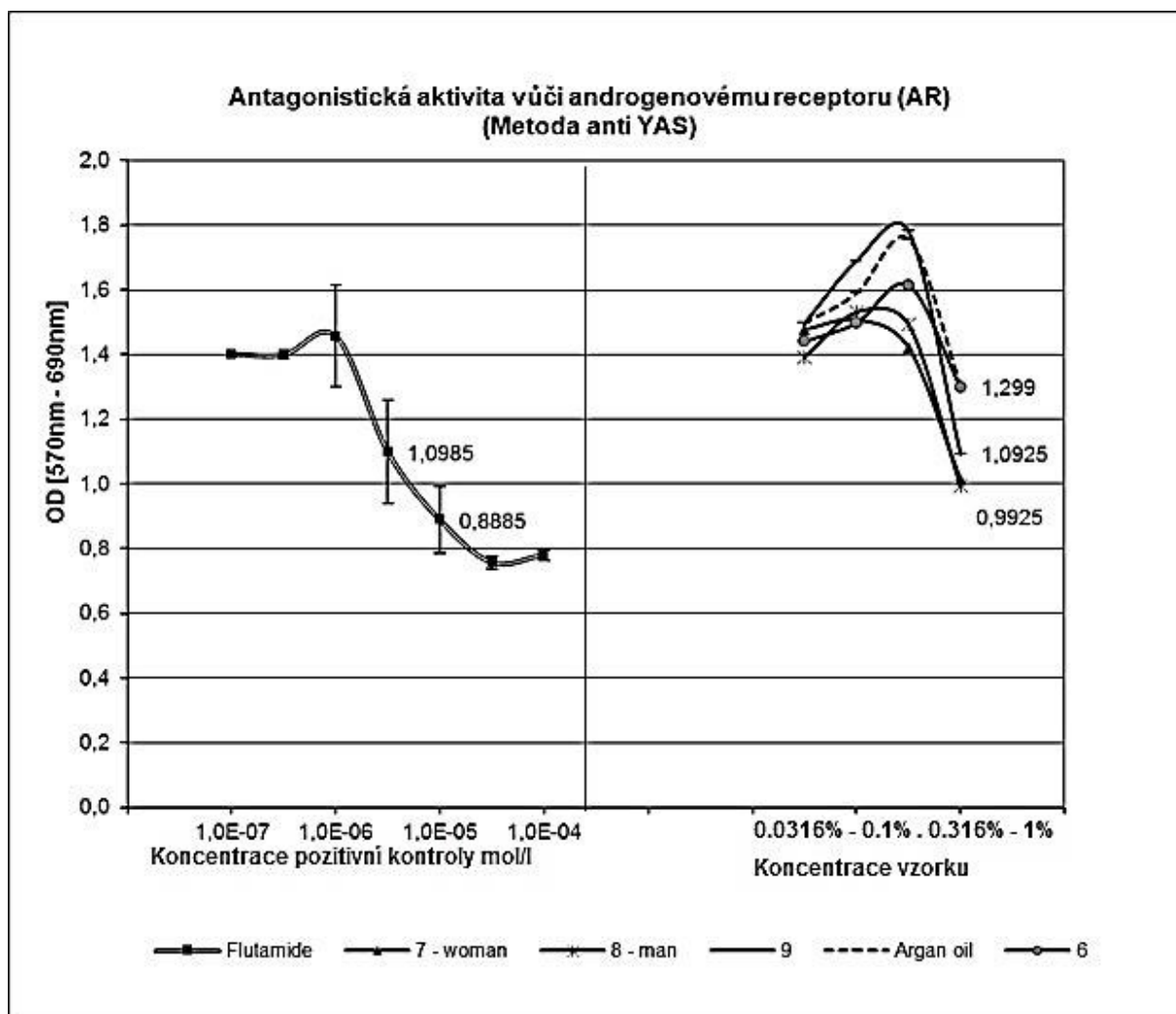
Graf 9. Antagonistická aktivita kosmetických přípravků s vysokým obsahem vonných složek (parfémované vody č. 2 a pánského deodorantu č. 5) vůči estrogenovému receptoru α , vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (4-Hydroxytamoxifen).

Vzorky kosmetických přípravků typu parfémů, deodorantů a parfémovaných vod vykazovaly antagonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru. V grafu 10. je prezentována sada vzorků, ve které byla identifikována antagonistická odpověď parfémované vody č. 1, 2, 3, 5.



Graf 10. Antagonistická aktivita kosmetických přípravků s vysokým obsahem vonných složek (parfémované vody č. 1, 2, 3, 5) vůči androgenovému receptoru, vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (Flutamid); (vzorek parfémované vody č. 4 vykazoval negativní aktivitu a vzorek 3 slabou antagonistickou aktivitu).

Vzorky kosmetických přípravků typu parfémů, deodorantů a parfémovaných vod vykazovaly antagonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru. V grafu 11. je prezentována sada vzorků, ve které byla identifikována antagonistická odpověď (vzorek 6, 7, 8, 9 a vzorek arganového oleje).



Graf 11. Antagonistická aktivita kosmetických přípravků s vysokým obsahem vonných složek (parfém pro ženy s deklarovaným obsahem feromonu č. 7, parfém pro muže s deklarovaným obsahem feromonu č. 8) vůči androgenovému receptoru, vyjádřené křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (Flutamid). Slabší aktivitu (v nejvyšší testované koncentraci) vykazoval vzorek arganového oleje, vzorek toaletní vody č. 9 a vzorek parfémované vody č. 6.

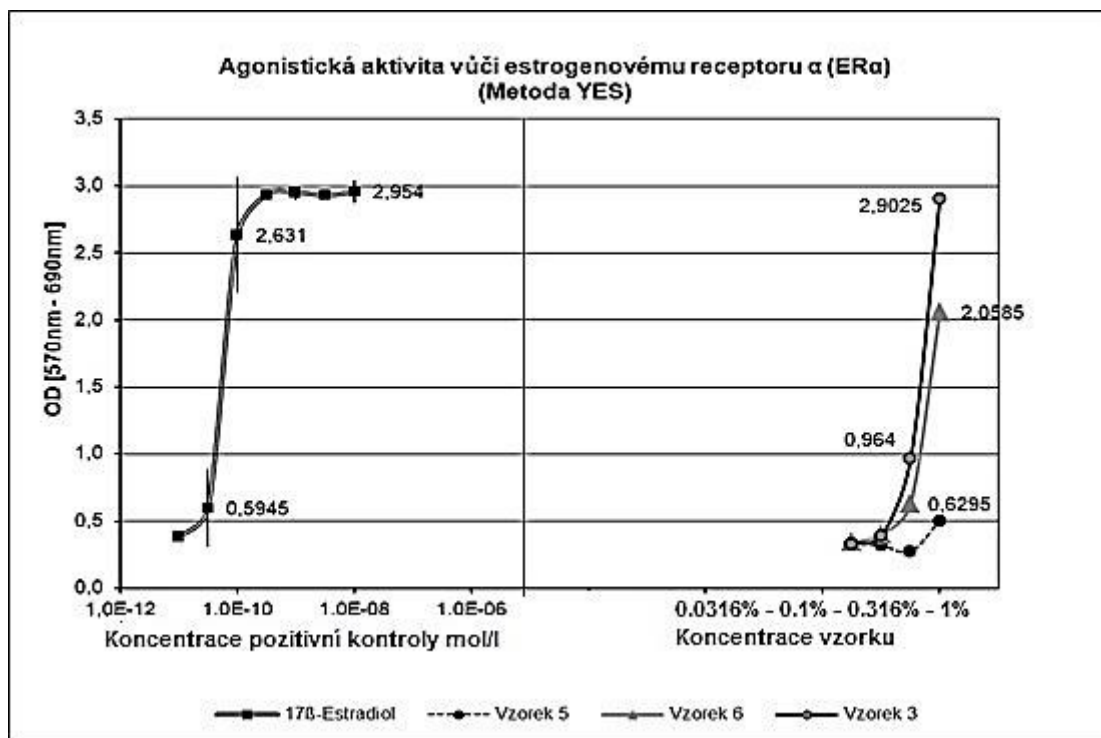
V tabulce 13. jsou shrnuty výsledky experimentů se spotřebními výrobky typu kosmetických přípravků.

Označení vzorku v grafech	Typ vzorku	Agonista ER α (metoda YES)	Antagonista ER α (metoda anti YES)	Agonista AR (metoda YAS)	Antagonista AR (metoda anti YAS)
Kolínská	Kolínská voda	N	++	N	++
Hemp elixír	Elixír s konopím olejové konzistence	N	+++	N	+++
Byl. krém	Bylinný krém	N	++	N	+
Krém sója	Krém anti-age s obsahem sóji	N	++	N	+
Argan oil	Arganový olej	N	N	N	++
1	Parfémovaná voda 1	N	N	N	++
2	Parfémovaná voda 2	N	++	N	+++
3	Parfém 3	N	N	N	+
4	Parfémovaná voda 4	N	N	N	N
5	Parfém deodorant pánský 5	N	++	N	+++
6	Parfémovaná voda 6	+	N	N	++
7 - woman	Parfém pro ženy s deklarovaným obsahem feromonu (Androstenol)	N	N	N	+++
8 - man	Parfém pro muže s deklarovaným obsahem feromonu (Androstenone)	N	N	N	+++
9	Toaletní voda	N	N	N	++

Tabulka 13. Potenciální endokrinní aktivita vzorků kosmetických přípravků – shrnutí. Kosmetické přípravky nejčastěji vykazovaly anti-androgenní aktivitu (antagonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru) nebo anti-estrogenní aktivitu (antagonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α).

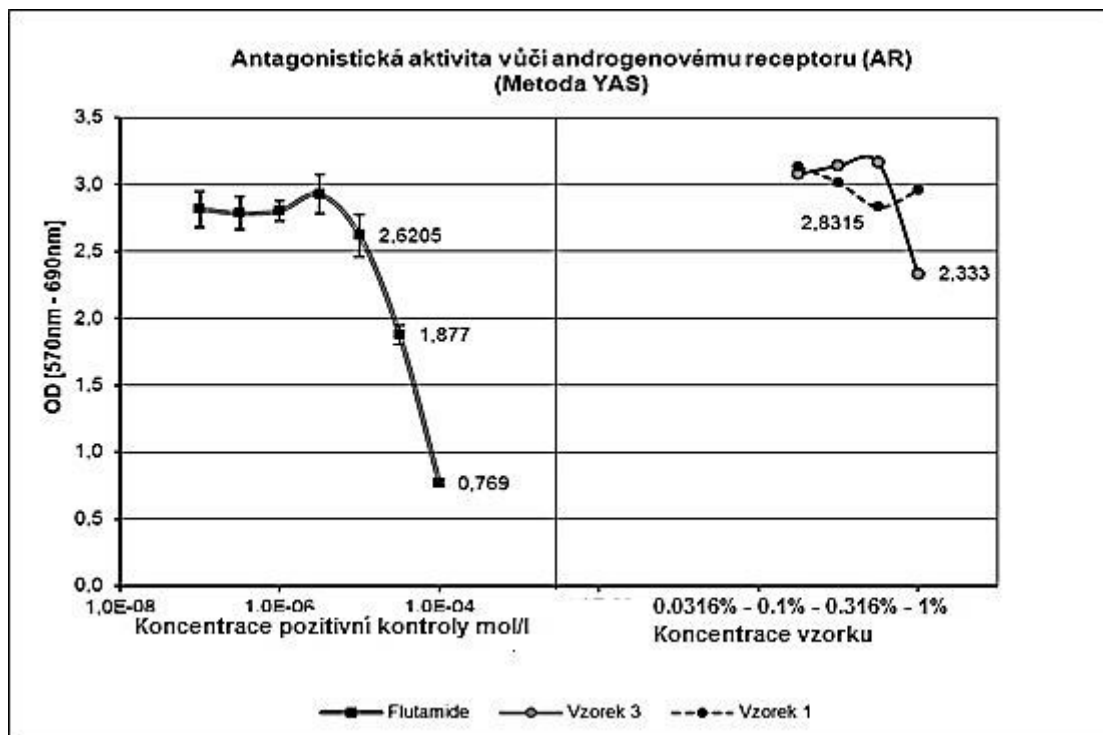
7.7. Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u vzorků doplňků stravy (produktů tradiční čínské medicíny)

Vzorky 3 a 6 doplňků stravy vykazovaly silnou agonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α . V grafu 12. je prezentována sada vzorků, ve které byla identifikována pozitivní odpověď.



Graf 12. Agonistická aktivita doplňků stravy ze sortimentu výrobků tradiční čínské medicíny s deklarovaným obsahem bylinných složek (vzorek 3, vzorek 6) vůči estrogenovému receptoru α , vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (17 β -estradiol). Velmi slabou estrogení aktivitu (v nejvyšší testované koncentraci) vykazoval vzorek 5.

Vzorek 3 doplňku stravy vykazoval antagonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru. V grafu 13. je prezentována sada vzorků, ve které byla identifikována pozitivní odpověď.



Graf 13. Antagonistická aktivita doplňku stravy ze sortimentu výrobků tradiční čínské medicíny s deklarovaným obsahem bylinných složek vůči androgenovému receptoru, vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (Flutamid). Slabou aktivitu vykazoval vzorek 1, silnější aktivitu (v nejvyšší testované koncentraci) vykazoval vzorek 3.

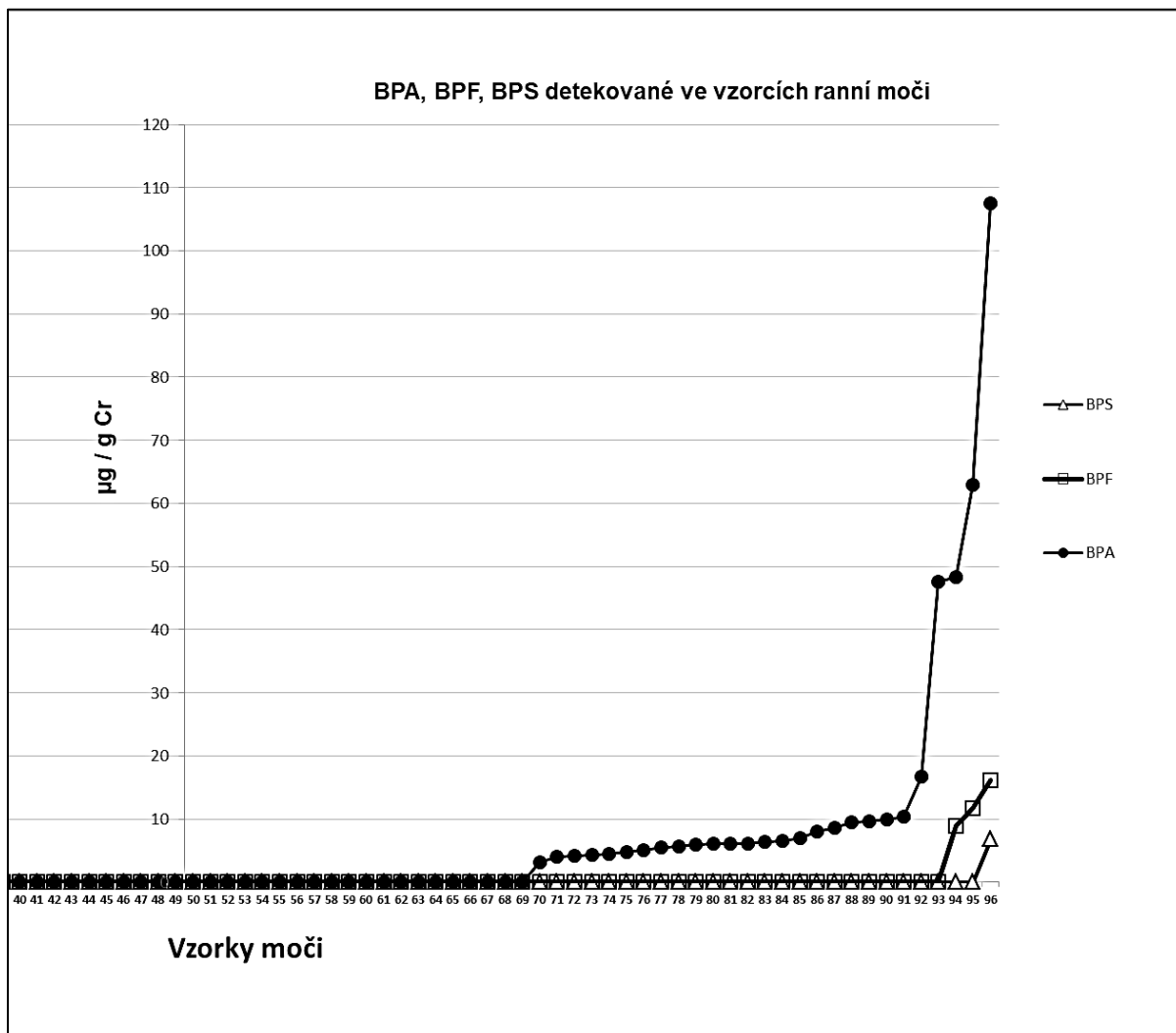
V tabulce 14. jsou shrnuty výsledky experimentů se spotřebními výrobky typu doplňků stravy ze sortimentu tradiční čínské medicíny.

Číslo vzorku	Dávkování uvedené na obalu	Deklarovaný obsah	Deklarované složení	Potenciální endokrinní aktivita
1	Dospělí: 4 tablety 3x denně. Děti od 3 let: 2 tablety 3 x denně.	100 tablet z koncentrovaných bylin 1:5	1g vyroben z 5g bylin: Broskvoň obecná – semeno, Děhel čínský – kořen, Světlice barvířská – květ, Achyrant dvojzubý – kořen, Rehmanie lepkavá – kořen, Pivoňka bělokvětá – červený kořen, Bigarádie – plod, Koprníček Walichův – oddenek, Platykodon velkokvětý – kořen, Lékořice – uprav. kořen.	NEGATIVNÍ
2	Dospělí: 4 tablety 3x denně. Děti od 3 let: 2 tablety 3 x denně.	100 tablet z koncentrovaných bylin 1:5	1 g vyroben z 5 g bylin: Rehmanie lepkavá – kořen vařený ve víně, Morinda lékařská – kořen, Děhel čínský – kořen, Gumojilm jilmový – kůra kmene a větvi, Kustovnice čínská – plod, Skořicovník čínský – kůra větvi, Jam čínský – hlíza, Dřín lékařský – plod, Kokořice čínská – semena.	NEGATIVNÍ
3	Dospělí: 4 tablety 3x denně. Děti od 3 let: 2 tablety 3 x denně.	100 tablet z koncentrovaných bylin 1:5	1 g vyroben z 5 g bylin: Světlice barvířská – květ; Broskvoň obecná – semeno; Šalvěj červenokořená – kořen; Kurkuma citvárová – oddenek; Křídlatka japonská – kořen a oddenek; Pivoňka bělokvětá – červený kořen; Toulec laločný – kořen, stonek; Zimolez japonský – stonek; Zevar výběžkatý – oddenek; Karbínec lesklý – nať; Děhel čínský – koncová část kořene.	ANTAGONISTA Androgenového receptoru AGONISTA Estrogenového receptoru α
4	Dospělí: 4 tablety 3x denně. Děti od 3 let: 2 tablety 3 x denně.	100 tablet z koncentrovaných bylin 1:5	1 g vyroben z 5 g bylin: Rehmanie lepkavá – kořen vařený ve víně; Skořicovník čínský – kůra větvi; Pomatka kokosová – plodnice houby; Pivoňka křovitá – kůra kořene; Jam čínský – hlíza; Dřín lékařský – plod; Žabník východní – oddenek.	NEGATIVNÍ
5	Dospělí: 4 tablety 3 x denně. Děti od 3 let: 2 tablety 3 x denně.	100 tablet z koncentrovaných bylin 1:5	1 g vyroben z 5 g bylin: Pivoňka bělokvětá – kořen, Koprníček Walichův – oddenek, Žabník východní – kořen, Pomatka kokosová – plodnice houby, Bodlák velkoubořový – oddenek, Děhel čínský – kořen.	AGONISTA Estrogenového receptoru α
6	Dospělí: 1 odm. 2 x denně. Děti od 3 let: 1 odm. 1 x denně.	30 g prášku z koncentrovaných bylin 1:5	1 g vyroben z 5 g bylin: Housenice čínská – plodnice houby. Obsah polysacharidů v extraktu je minimálně 30 % (200 mg/g).	AGONISTA Estrogenového receptoru α
7	Dospělí: Doporučená denní dávka je 1 x denně 4 odměrky.	100g koncentrovaný bylinný prášek 1:5	Jam čínský (hlíza), Skořicovník čínský (kůra větvi).	NEGATIVNÍ
8	Dospělí: 4 odměrky 1 x denně.	30 g prášku z koncentrovaných bylin 1:5	Drmek obecný – kořen, Děhel čínský – kořen, Děhel čínský – koncová část kořene.	NEGATIVNÍ
9	Dospělí: 1 lžička (součást balení) za den.	100 % čistý extrakt; 30 g; 80 mg/g ginsenosidů.	6 letý korejský červený ženšen Voda, všeohoj ženšenový.	NEGATIVNÍ

Tabulka 14. Potenciální endokrinní aktivita vzorků doplňků stravy – shrnutí.

7.8. Stanovení prediktivních indikátorů expozice bisfenolům

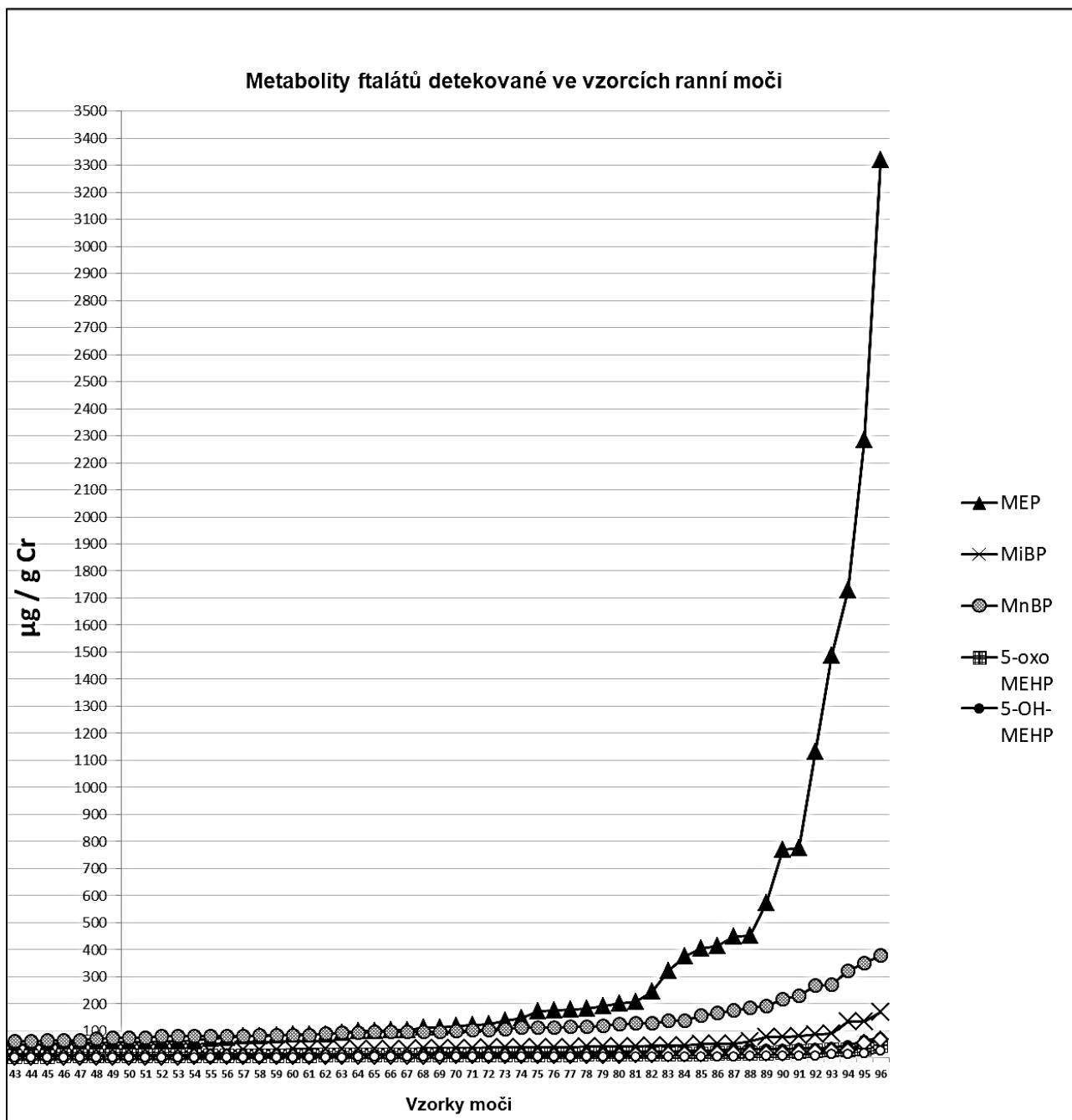
Analýzou 96 vzorků ranní moči byly zjištěny koncentrace BPA, BPF, BPS ($\mu\text{g/g}$ kreatininu). Ojedíněle byly zjištěny nízké koncentrace u BPF (3 vzorky) a BPS (1 vzorek). Nejvyšší četnost pozitivních vzorků i nejvyšší koncentrace byly zjištěny u BPA (27 vzorků).



Graf 14. Zjištěné koncentrace ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u bisfenolu A (BPA), bisfenolu S (BPS) a bisfenolu F (BPF) v 96 vzorcích ranní moči. Vzorky jsou seřazeny od nejnižší do nejvyšší koncentrace. První pozitivní vzorek, ve kterém byl detekován BPA má číslo 70. První pozitivní vzorek, ve kterém byl detekován BPF, má číslo 94. BPS byl detekován pouze v jediném vzorku moči č. 96. Ve vzorcích 1 – 69 byly koncentrace bisfenolů nižší než byl limit kvantifikace analytické metody (<LOQ). Jako prediktivní indikátor expozice bisfenolům je možno využít BPA, vzhledem k ojedinělým nálezům BPF a BPS je však vhodné monitorovat i tyto analyty, z důvodu jejich možného využívání jako náhrad BPA.

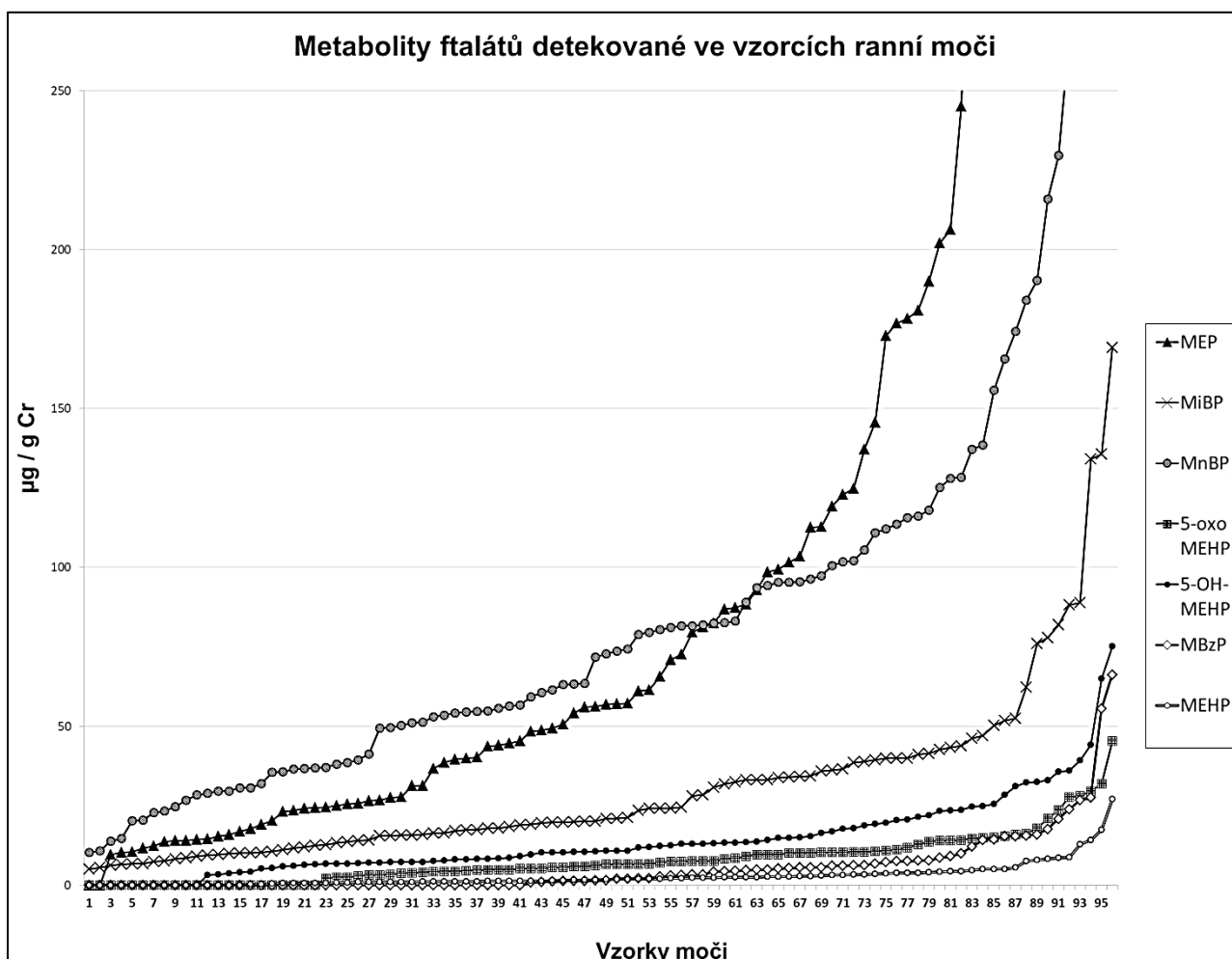
7.9. Stanovení prediktivních indikátorů expozice ftalátům

Analýzou 96 vzorků ranní moči byly zjištěny koncentrace metabolitů ftalátů ($\mu\text{g/g}$ kreatininu). Byla zjištěna vysoká četnost pozitivních vzorků u všech analytů. Velmi vysoké hodnoty byly zjištěny u MEP (viz graf 15.).



Graf 15. Zjištěné koncentrace ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u monoethyl ftalátu (MEP), mono isobutyl ftalátu (MiBP), monobutyl ftalátu (MnBP), 5-oxo-monoethyl hexyl ftalátu (5-oxo MEHP) a 5-hydroxy-monoethyl hexyl ftalátu (5-OH-MEHP) v 96 vzorcích ranní moči. Vzorky jsou seřazeny od nejnižší do nejvyšší koncentrace. Jako prediktivní indikátory expozice ftalátům je možno využít monoethyl ftalát (MEP), mono butyl ftalát (MnBP) a mono isobutyl ftalát (MiBP).

Analýzou 96 vzorků ranní moči byly zjištěny koncentrace metabolitů ftalátů ($\mu\text{g/g}$ kreatininu). Nejvyšší četnost byla zjištěna u MEP, MnBP a MiBP. Velmi vysoké hodnoty byly zjištěny u MEP (viz graf 16.).



Graf 16. Detail zjištěných koncentrací 0 - 250 ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u monoethyl ftalátu (MEP), monoisobutylftalátu (MiBP), monobutyl ftalátu (MnBP), 5-oxo-monoethyl hexyl ftalátu (5-oxo MEHP) a 5-hydroxy monoethylhexylftalátu (5-OH MEHP) v 96 vzorcích ranní moči. Vzorky jsou seřazeny od nejnižší do nejvyšší koncentrace. Ve všech vzorcích moči byly identifikovány některé z metabolitů ftalátů. Jako prediktivní indikátory expozice ftalátům lze využít MEP, MnBP a MiBP, které se vyskytovaly téměř ve všech vzorcích.

V tabulce 15. jsou shrnuty výsledky analýzy 96 vzorků moči.

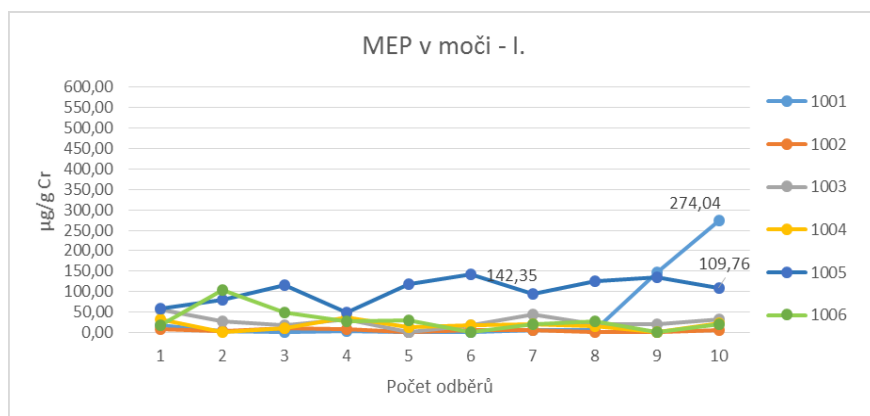
Statistický ukazatel	Základní statistické ukazatele – hodnot [µg/g Cr] analytů z 96 vzorků moči n = 96									
	MEP	MiBP	MnBP	5-oxo-MEHP	5-OH-MEHP	MBzP	MEHP	BPS	BPF	BPA
Četnost hodnot > LOQ	94	96	96	74	85	55	81	1	3	27
Četnost hodnot < LOQ	2	0	0	22	11	41	15	95	96	69
Aritmetický průměr (µg/g Cr)	210,17	30,54	87,60	10,27	15,81	9,60	3,38	6,82	12,27	15,74
Geometrický průměr hodnot >LOQ (µg/g Cr)	71,22	22,76	66,90	8,28	12,62	5,80	2,25	6,82	11,9	9,00
Medián hodnot >LOQ (µg/g Cr)	56,9	20,54	72,26	7,98	12,34	5,63	2,28	6,82	11,75	6,4
PERCENTIL 95 (µg/g Cr)	865,3	83,55	239,15	24,75	35,80	21,61	8,65	6,82	15,76	58,51
PERCENTIL 75 (µg/g Cr)	127,92	38,67	102,90	10,54	18,18	6,23	3,36	6,82	13,97	9,82
PERCENTIL 50 (µg/g Cr)	56,56	20,54	72,26	6,37	10,71	1,50	1,77	6,82	11,75	6,37
PERCENTIL 25 (µg/g Cr)	24,40	13,69	3,73	2,50	6,83	0	0,88	6,82	10,3	5,31
Nejvyšší hodnota (µg/g Cr)	3318,1	169,2	378,6	45,3	75,2	66,3	27,1	6,82	16,2	107,5

Tabulka 15. Základní statistické ukazatele vyplývající ze základního statistického zhodnocení výsledků analýzy 96 vzorků moči. Nejvyšší hodnoty i četnost detekce u látek ze skupiny ftalátů byly zjištěny u MEP, MiBP, MnBP. Nejvyšší hodnoty i četnost detekce u látek ze skupiny bisfenolů byly zjištěny u BPA. Z výsledků vyplývá, že četnost detekce i zjištěné koncentrace u bisfenolů jsou mnohem nižší než u ftalátů. U BPS i BPF jde o ojedinělé nálezy. Vysoké hodnoty (u MEP, MnBP) naznačují vysoké koncentrace diethyl ftalátu (DEP) a dibutyl ftalátu (DBP) v prostředí. Hodnoty Percentilu 75 a 95 naznačují, že vysoké hodnoty ftalátů (stovky µg/g Cr) mohou být s vysokou pravděpodobností detekovány u min. 25 % vzorků moči.

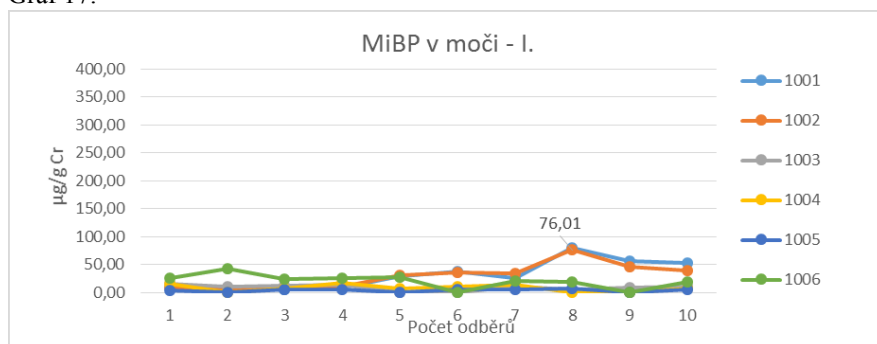
7.10. Sledování efektivity intervenčních opatření pro potenciální snížení expozice ftalátům a bisfenolům

Ve dvou fázích studie (FÁZE I, FÁZE II byly zjišťovány koncentrace metabolitů ftalátů, BPA, BPF a BPS v moči ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) (viz grafy 17. - 36).

FÁZE I
(konzumace konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách)

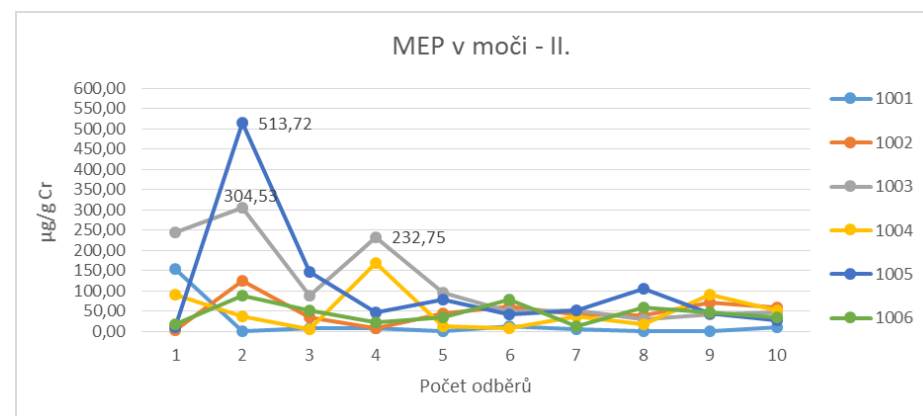


Graf 17.

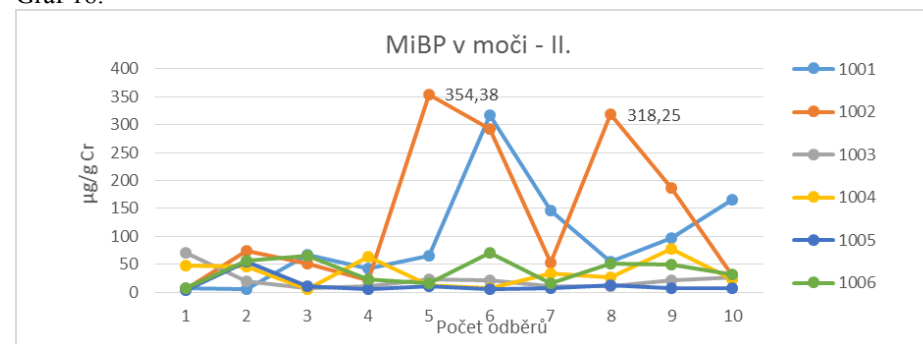


Graf 19.

FÁZE II
(vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách)



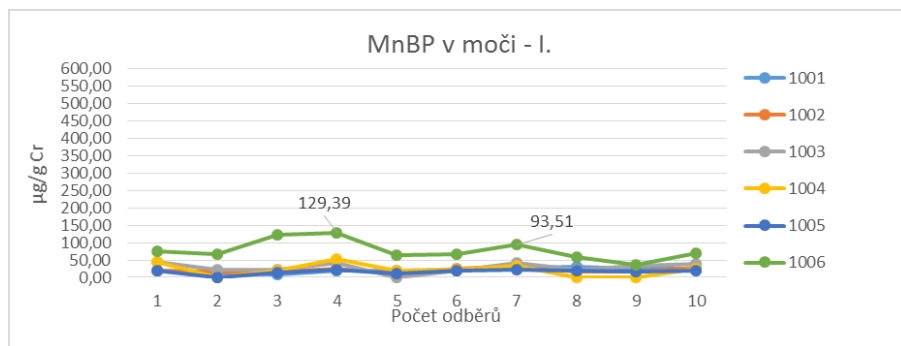
Graf 18.



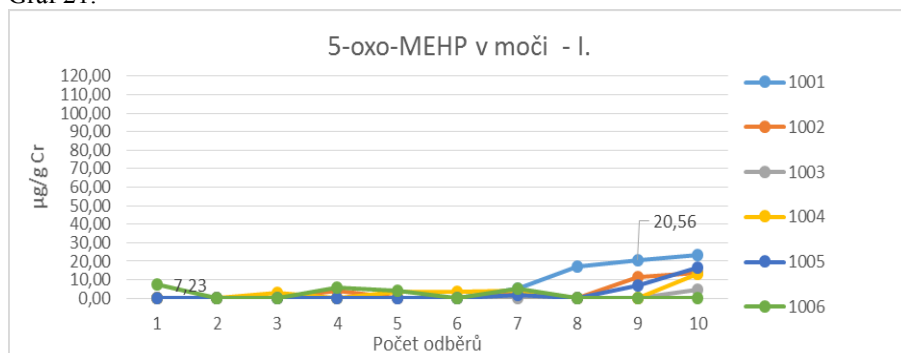
Graf 20.

Graf 17., 18, 19., 20. Detail zjištěných koncentrací ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u monoethyl ftalátu (MEP), mono isobutyl ftalátu (MiBP) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci MEP a MiBP. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Zajímavé je, že ojedinělé vysoké hodnoty korelují s prostředím (domácností), např. u MiBP v obou fázích studie.

FÁZE I
(konzumace konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách)

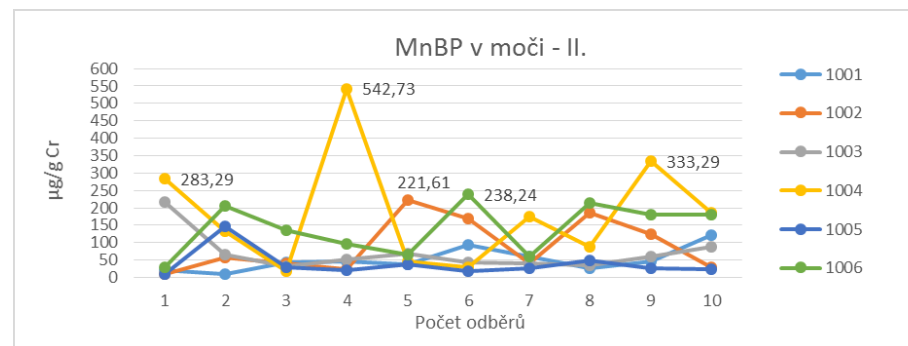


Graf 21.

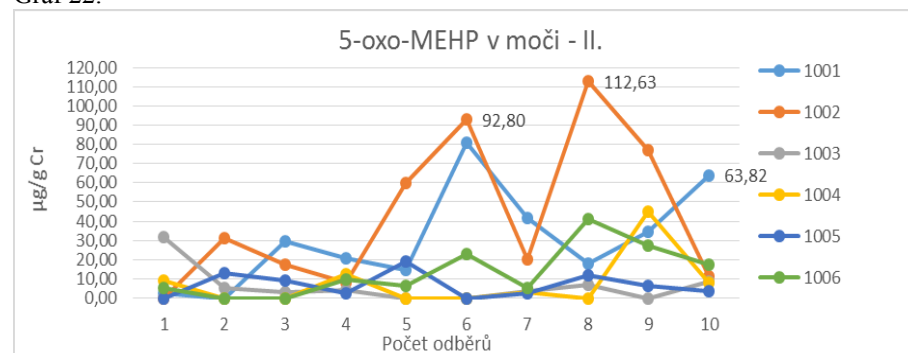


Graf 23.

FÁZE II
(vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách)



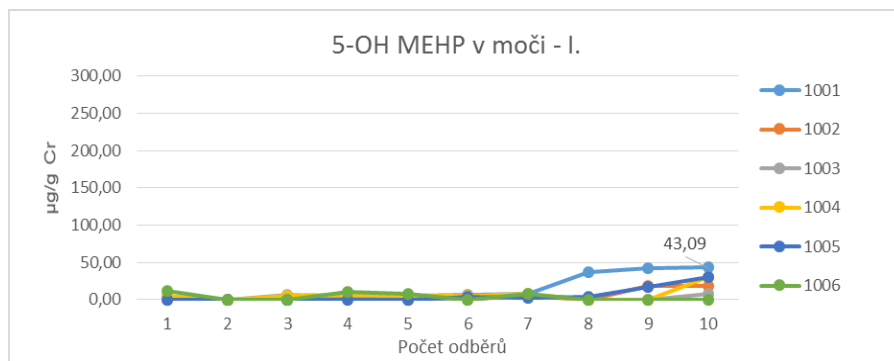
Graf 22.



Graf 24.

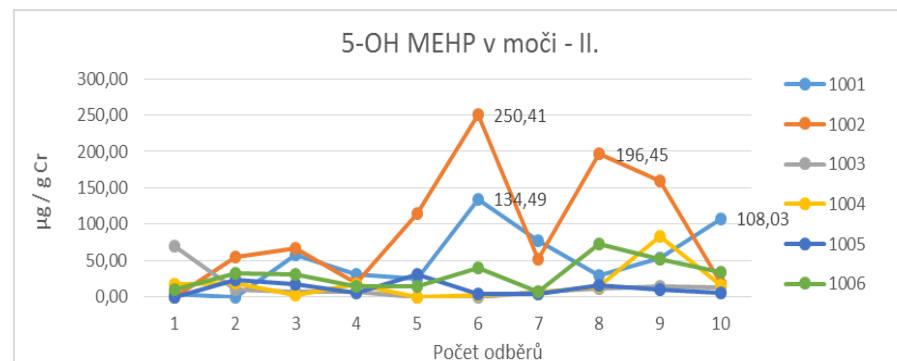
Graf 21., 22., 23., 24. Detail zjištěných koncentrací (µg/g kreatininu) u monobutyl ftalátu (MnBP) a mono(2-ethyl-5-oxohexyl)ftalátu (5-oxo-MEHP) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci ftalátů. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Zajímavé je, že ojedinělé vysoké hodnoty korelují s prostředím (domácností), např. ve Fázi II – u 5-oxo-MEHP.

FÁZE I
(konzumace konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách)

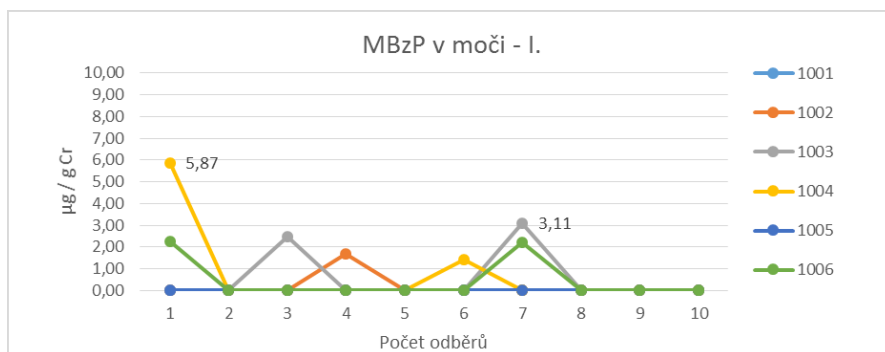


Graf 25.

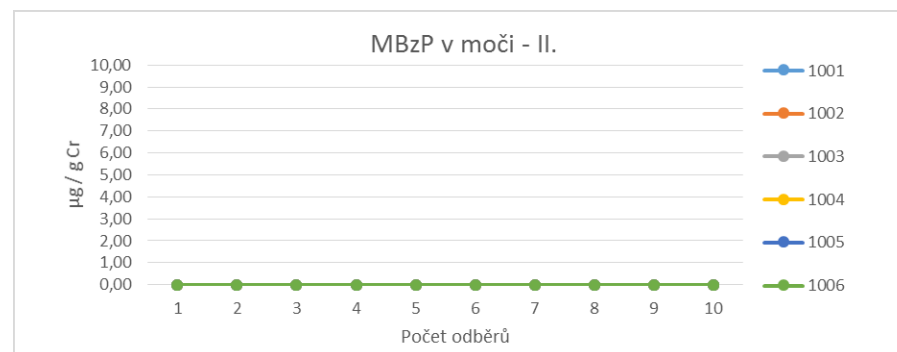
FÁZE II
(vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách)



Graf 26.



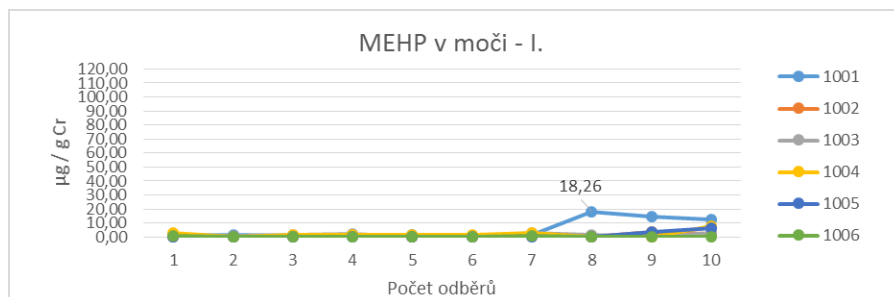
Graf 27.



Graf 28.

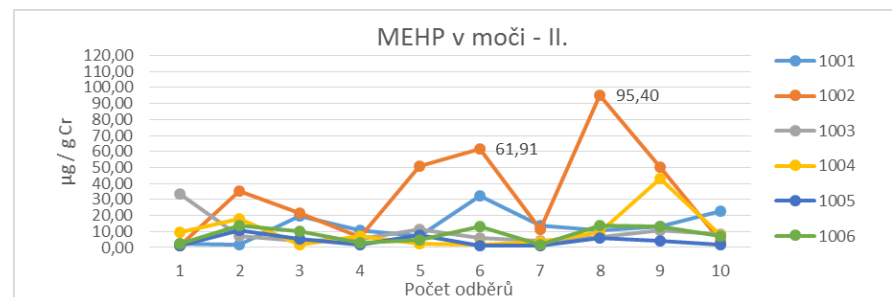
Graf 25., 26., 27., 28. Detail zjištěných koncentrací (µg/g kreatininu) u monobenzyl ftalátu (MBzP) a mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)ftalátu (5-OH-MEHP) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci ftalátů. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí od účastníků ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Zajímavé je, že ojedinělé vysoké hodnoty korelují s prostředím (domácností), např. ve Fázi II – u 5-OH-MEHP (křivka 1001, 1002).

FÁZE I
(konzumace konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách)



Graf 29.

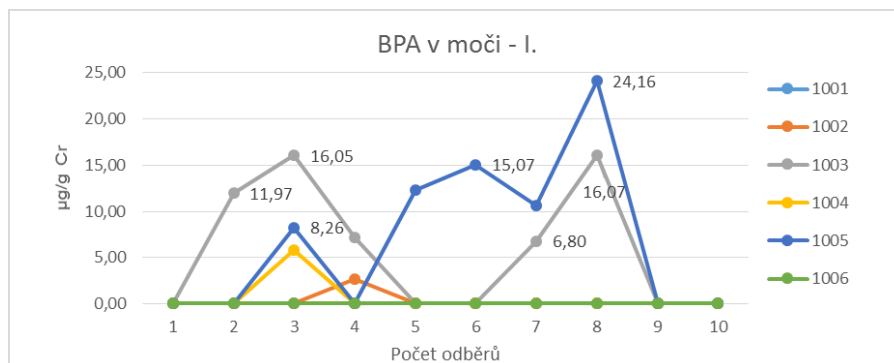
FÁZE II
(vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách)



Graf 30.

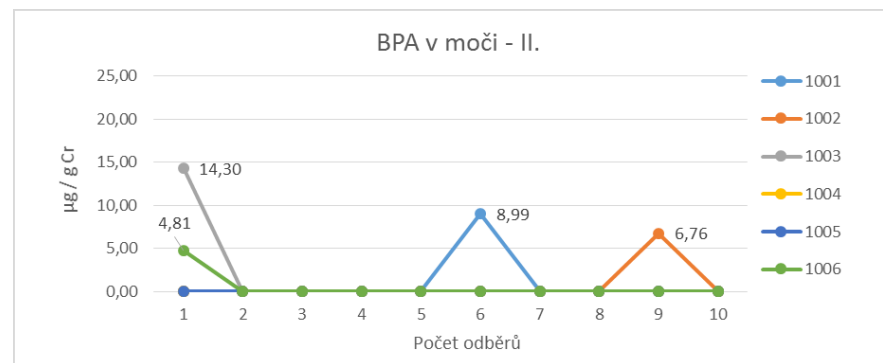
Graf 29., 30. Detail zjištěných koncentrací ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u mono ethylhexyl ftalátu (MEHP) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci ftalátů. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí od účastníků ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Zajímavé je, že ojedinělé vysoké hodnoty korelují s prostředím (domácností), např. ve Fázi II – u MEHP (křivka 1001, 1002).

FÁZE I
(konzumace konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách)

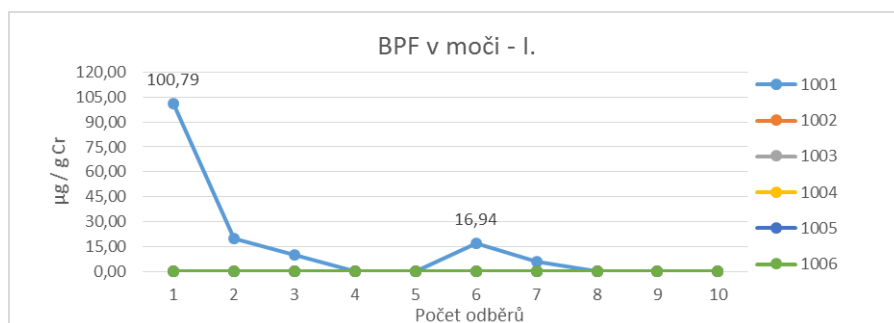


Graf 31.

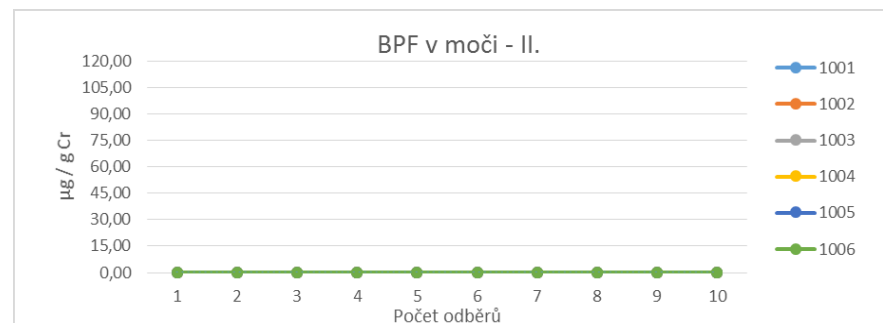
FÁZE II
(vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách)



Graf 32.

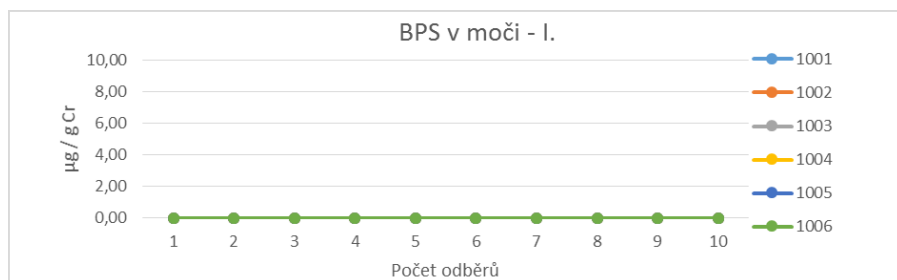


Graf 33.

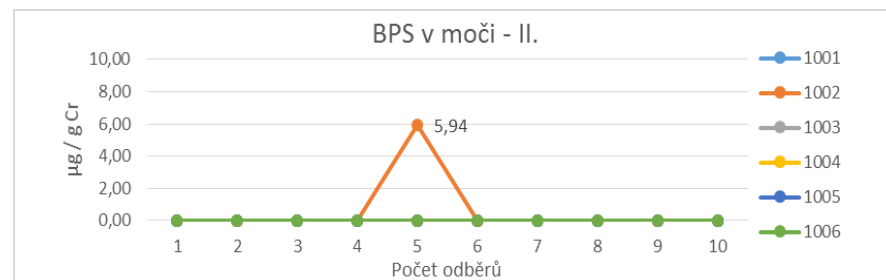


Graf 34.

Graf 31., 32., 33., 34. Detail zjištěných koncentrací (µg/g kreatininu) u bisfenolu A (BPA) a bisfenolu F (BPF) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci bisfenolů. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí od účastníků ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Zajímavé je, že ojedinělé vysoké hodnoty korelují s prostředím (domácností), např. ve Fázi I – u BPA (křivky 1003, 1005) a ve Fázi II (křivky 1001, 1002). Vysoké hodnoty BPF (Fáze I, křivka 1001, odběr 1) naznačují ojedinělou přítomnost BPF v prostředí.



Graf 35.



Graf 36.

Graf 35., 36. Detail zjištěných koncentrací ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u bisfenolu A (BPA) a bisfenolu F (BPF) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci bisfenolů. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí od účastníků ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Jediná pozitivní hodnota ve Fázi II (křivka 1002, odběr 5) naznačuje ojedinělou přítomnost BPS v prostředí.

V tabulkách 16. a 17. jsou shrnuty výsledky analýzy moči ve dvou fázích studie (FÁZE I, FÁZE II) zaměřené na efektivitu intervenčních opatření pro potenciální snížení expozice ftalátům a bisfenolům.

Základní statistické ukazatele	MEP	MiBP	MnBP	5-oxo-MEHP	5-OH-MEHP	MBzP	MEHP	Celkový počet hodnot	Bisfenol S	Bisfenol F	Bisfenol A	Celkový počet hodnot
N	60	60	60	60	60	60	60	420	60	60	60	180
ČETNOST negativních hodnot (<LOQ)	11	10	5	39	26	53	27	171	60	55	48	163
ČETNOST pozitivních hodnot (>LOQ)	49	50	55	21	34	7	33	249	0	5	12	17
Průměr všech hodnot	37,96	16,82	31,22	2,94	6,50	0,32	1,79		nedostatek hodnot	2,56	2,28	
Průměr pozitivních hodnot	46,48	20,18	34,05	8,41	11,47	2,70	3,24		nedostatek hodnot	30,72	11,40	
Nejvyšší hodnota	274,04	76,01	129,39	20,56	43,09	5,87	18,26		nedostatek hodnot	100,79	24,16	
Geometrický průměr	27,15	14,63	28,12	6,45	8,26	2,44	2,08		nedostatek hodnot	11,92	9,92	
Medián	19,27	10,01	22,80	nedostatek hodnot	3,76	nedostatek hodnot	1,02		nedostatek hodnot	nedostatek hodnot	nedostatek hodnot	

Tabulka 16. Základní statistické ukazatele hodnot (FÁZE I).

Základní statistické ukazatele	MEP	MiBP	MnBP	5-oxo-MEHP	5-OH-MEHP	MBzP	MEHP	Celkový počet hodnot	Bisfenol S	Bisfenol F	Bisfenol A	Celkový počet hodnot
N	60	60	60	60	60	60	60	420	60	60	60	180
ČETNOST negativních hodnot (<LOQ)	4	0	0	14	6	60	0	84	59	60	56	175
ČETNOST pozitivních hodnot (>LOQ)	56	60	60	46	54	0	60	336	1	0	4	5
Průměr všech hodnot	65,49	57,34	95,83	18,02	36,76	nedostatek hodnot	13,32		nedostatek hodnot	nedostatek hodnot	0,58	
Průměr pozitivních hodnot	70,17	57,34	95,83	23,50	40,84	nedostatek hodnot	13,32		nedostatek hodnot	nedostatek hodnot	8,72	
Nejvyšší hodnota	513,72	354,38	542,73	112,63	250,41	nedostatek hodnot	95,40		5,94	nedostatek hodnot	14,30	
Geometrický průměr	41,65	28,51	62,54	13,78	22,40	nedostatek hodnot	7,51		nedostatek hodnot	nedostatek hodnot	8,04	
Medián	44,37	26,62	54,35	8,22	17,38	nedostatek hodnot	7,42		nedostatek hodnot	nedostatek hodnot	nedostatek hodnot	

Tabulka 17. Základní statistické ukazatele hodnot (FÁZE II).

Shrnutí výsledků (grafy 18. – 36., tabulka 16., 17.):

U ftalátů byla celková četnost negativních hodnot (<LOQ) ve Fázi I (40,7 %) vyšší než ve Fázi II (20 %). Celkový počet negativních hodnot byl nižší než u bisfenolů. Zároveň byly zjištěny ve Fázi II cca min. 2 x vyšší hodnoty (průměr všech hodnot, průměr pozitivních hodnot, geometrický průměr, medián). Hodnoty se řádově nelišily mezi oběma fázemi (desítky až stovky $\mu\text{g/g}$ kreatininu). Vyšší koncentrace metabolitů di-ethylhexyl ftalátu (DEHP), tj. 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP, MEHP a dále vyšší koncentrace MiBP a BPA byly zjištěny u účastníků studie užívajících stejnou domácnost (křivka 1001, 1002, graf 19., 20., 24., 26., 30., 32.).

U bisfenolů byla celková četnost negativních hodnot (<LOQ) ve Fázi I (90,5 %) nižší než ve Fázi II (97,2 %). Celkový počet negativních hodnot byl vyšší než u ftalátů. Nejzajímavější rozdíly v četnosti detekce mezi oběma fázemi byly zjištěny u bisfenolu A. Četnost negativních hodnot u BPA ve Fázi I byla 80 %, přičemž ve Fázi II (tj. při vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách) vzrostla na 93,3 %. Zároveň byly zjištěny ve Fázi II nižší hodnoty (průměr všech hodnot, průměr pozitivních hodnot, geometrický průměr, medián, nejvyšší hodnota). Hodnoty u BPA se řádově nelišily mezi oběma fázemi (jednotky až desítky $\mu\text{g/g}$ kreatininu). Ojedinelou vysokou hodnotu u BPF (křivka 1001, Fáze I, graf 33.) - 100,79 $\mu\text{g/g}$ kreatininu lze vysvětlit kontaminací z pracovního prostředí (účastník pracuje jako chemik). Vyšší koncentrace MEP a BPA byly zjištěny u účastníků studie užívajících stejnou domácnost (křivka 1003, 1005, graf 18., 31.).

7.11. Návrh informačního materiálu, vhodného pro edukaci odborné veřejnosti a preventivní poradenství ohledně potenciálního snižování expozice ED

S ohledem na různorodost expozičních cest a rozšíření chemických látek s potenciálem interagovat s endokrinním systémem byl informační materiál připraven jako srozumitelný návod 10 rad, jak potenciálně snižovat expozici ED v běžném životě. Byl připraven návrh rozšířené verze s možností vydání jako brožura (obsahující podrobnější popis preventivních opatření) a zkrácená jednostránková verze 10 rad, obsahující názornou informativní grafiku a minimum textu, s cílem podnítit zájem širší veřejnosti o téma endokrinní disrupce. Některé z preventivních přístupů jsou také obsahem prevence např. kardiovaskulárních onemocnění, onkologických onemocnění nebo obezity (např. vyvážená strava z čerstvých surovin, nekuřáctví a udržování zdravé tělesné váhy a hladiny cholesterolu). Z vědeckých a odborných informací z více než 200 literárních zdrojů vyplývá, že i tato opatření mohou mít vliv na snížení expozice mnoha chemickým látkám z prostředí, mezi kterými se mohou vyskytovat také látky s endokrinní aktivitou. Název informačního materiálu je “Endokrinní disruptory, 10 rad jak se před nimi chránit” a uvádí těchto 10 rad:

- vybírejte spotřební výrobky a potraviny s rozumem

- dodržujte pestrou stravu a vhodnou domácí přípravu čerstvého jídla
- omezte spotřebu konzervovaných potravin a plechovkových nápojů
- vždy konzultujte užívání doplňků stravy s lékařem
- vybírejte zodpovědně kosmetické přípravky a čisticí prostředky
- myjte si ruce a používejte ochranné prostředky
- zbavujte domácnost prachu a větrejte
- nekuřte
- preferujte pohyb na čerstvém vzduchu a omezte pobyt v místnostech nebo automobilech
- udržujte si zdravou váhu a snažte se snižovat hladinu cholesterolu

Účelem bylo shrnout preventivní doporučení, která mohou být aplikovatelná v běžném životě a mohou dle dosavadních vědecky podložených informací ve svém souhrnu přispět ke snižování expozice nejen ED, ale i ostatním kontaminujícím chemickým látkám.

ENDOKRINNÍ DISRUPTORY

10 RAD JAK SE PŘED NIMI CHRÁNIT

Endokrinní disruptory jsou **látky syntetického nebo i přírodního původu**, které mají schopnost reagovat se systémem buněk, tkání a žláz s vnitřní sekrecí produkujícími hormony, který je řízen molekulárními signály (endokrinním systémem). Mechanismem účinku endokrinních disruptorů je **napodobování funkcí přirozených hormonů**. Mají schopnost se namísto nich vázat na jejich receptory. **Mohou tak narušovat („disruptovat“) přenos endokrinních signálů a přispívat k rozvoji zdravotních poruch.**

Chemické skupiny, ve kterých byly již identifikovány některé látky s výše popsanou aktivitou, jsou různorodé. Mnoho látek se používá např. při **výrobě plastů**, v **zemědělství**, **stavebnictví**, **elektrotechnice** a jsou přítomné v **různých spotřebních výrobcích**. Jde např. o látky ze **skupiny bisfenolů** (např. bisfenol A), **ftalátů** (např. benzyl butyl ftalát, dibutyl ftalát), některé **antimikrobiální látky** (jako parabeny, fenoly, ketoconazol, kyselina boritá a její sloučeniny), dále např. některé **UV filtry**, **cyklické siloxany**, **detergenty**, **zpomalovače hoření**, **pesticidy**, **toxické kovy**, **fytoaktivní látky** obsažené v rostlinách atd.

V kosmetice je řada takových látek již zakázaných (např. ftaláty kromě diethylftalátu, který je bezpečný, a některé parabeny). Problematika endokrinních disruptorů se však neustále vyvíjí a endokrinní aktivita je často nově identifikována. **Člověk je vystaven denně mnoha chemickým látkám a je zranitelný zejména během fází zrychleného vývoje – v těhotenství a v dětství.** V reálném životě je velmi těžké se chemickým látkám zcela vyhnout. Některá opatření však mohou koncentrace chemických látek, které se dostanou do těla, účinně snižovat.

1.

VYBÍREJTE
SPOTŘEBNÍ VÝROBKY
A POTRAVINY
S ROZUMEM

2.

DODRŽUJTE
PESTROU STRAVU
A VHODNOU
DOMÁČÍ PŘÍPRAVU
ČERSTVÉHO JÍDLA

3.

OMEZTE
SPOTŘEBU
KONZEROVANÝCH
POTRAVIN
A PLECHOVKOVÝCH
NÁPOJŮ

4.

VŽDY
KONZULTUJTE
UŽÍVÁNÍ
DOPLŇKŮ STRAVY
S LÉKAŘEM

5.

VYBÍREJTE
ZODPOVĚDNĚ
KOSMETICKÉ
PŘÍPRAVKY A ČISTIČÍ
PROSTŘEDKY

6.

MYJTE SI RUCI
A POUŽÍVEJTE
OCHRANNÉ
PROSTŘEDKY

7.

ZBAVUJTE
DOMÁČNOST PRACHU
A VĚTREJTE

8.

NEKURŤTE

9.

PREFERUJTE
POHYB NA
ČERSTVÉM VZDUCHU
A OMEZTE POBYT
V MÍSTNOSTECH
NEBO
AUTOMOBILECH

10.

UDRŽUJTE SI
ZDRAVOU VÁHU
A SNAŽTE SE
SNIŽOVAT HLADINU
CHOLESTEROLU

Mezi tato opatření patří:

1. VYBÍREJTE SPOTŘEBNÍ VÝROBKY A POTRAVINY S ROZUMEM

Povinnost uvádět na trh bezpečné výrobky je na straně výrobce nebo dovozce, ale spotřebitel významně ovlivňuje bezpečnost jejich používání, a to již výběrem spotřebního výrobku. Plasty, ve kterých byly dříve nalezeny endokrinní disruptory (např. polykarbonát, PVC), byly již nahrazeny novějšími bezpečnějšími materiály. V běžném životě se však setkáváme se spotřebními výrobky různé kvality a stáří. **V citlivých obdobích vývoje proto vybírejte výrobky s minimálním obsahem plastového materiálu a potraviny balené ve skle.** Aktivně zjišťujte, zda existují bezpečnější alternativy, kdykoliv si vyberete na trhu plastový výrobek.

Ke skladování, přípravě a ohřívání potravin, zejména s vyšším obsahem tuku nebo s vyšší teplotou, lze doporučit jako nejvhodnější materiál sklo nebo nerezovou ocel. Při nákupu nových oděvů před prvním použitím oděv vždy vyperte. Informace o nebezpečných nepotravinářských výrobcích (např. textilních výrobcích, oděvech, hračkách, kosmetických přípravcích apod.) můžete nalézt v systému RAPEX, který upozorňuje spotřebitele na výrobky, které mohou ohrozit jejich bezpečnost a zdraví a zahrnuje i chemické riziko, týkající se i látek s endokrinní aktivitou.



2. DODRŽUJTE PESTROU STRAVU A VHODNOU DOMÁCI PŘÍPRAVU ČERSTVÉHO JÍDLA

U mnoha potravin bylo zjištěno, že obsahují **fytoaktivní látky schopné reagovat s endokrinním systémem** – známým příkladem je např. sója nebo **grapefruitová šťáva**. Jednostranně zaměřená strava, např. vegetariánská, může být zdrojem vyššího přísunu fytoaktivních látek. Konzultujte výběr mléčných náhrad pro kojence i vhodný typ stravování s dětským lékařem.

Některé **pesticidy**, látky na ochranu rostlin – např. insekticidy a antimikrobiální látky, byly **spojovány s narušováním endokrinního systému**. Zejména v citlivých fázích vývoje (těhotenství, dětství) kontrolujte na etiketách výrobků, které

látky jsou uvedeny např. jako **konzervanty**. Využívejte hlavně **potravinu čerstvé** namísto zpracovaných (např. čerstvé kuřecí maso namísto mražených kuřecích nuget), **potravinu domácího původu** (např. ovoce, zelenina, vejce) nebo **z bioprodukce** a dejte **přednost domácí přípravě jídla**.

Používejte co nejméně plastů. **Jako nejvhodnější materiál pro přípravu jídla lze doporučit nerezovou ocel**. Omezte smažení a pečení, při kterém může docházet ke vzniku látek vykazujících mimo jiné i endokrinní aktivitu. Omezte stravování v restauracích nebo občerstveních rychlého typu. V sušených potravinách mohou být obsaženy endokrinně aktivní mykotoxiny. Dávejte přednost čerstvému ovoci a zelenině. Některé těžké kovy (např. kadmium) nebo látky na ochranu rostlin kontaminují nadzemní části rostlin ze vzduchu. Odstraňujte slupku či pečlivě omývejte ovoce i zeleninu, včetně zeleniny listové.

Informace o nebezpečných potravinách můžete získat ze **systému rychlého varování pro potraviny a krmiva RASFF**.



3. OMEZTE SPOTŘEBU KONZEROVANÝCH POTRAVIN A PLECHOVKOVÝCH NÁPOJŮ

Pro zabránění korozi se při výrobě konzerv a plechovek využívá **vnitřní plastová vrstva**, která může obsahovat potenciální endokrinní disruptory (např. bisfenol A). Výrobky označené „**bez BPA**“ mohou obsahovat **podobné chemické látky ze skupiny bisfenolů** jako náhradu. Tyto látky mohou za některých okolností **přecházet z obalu do potravin**. Náhradou konzervovaných potravin za potraviny čerstvé můžete snížit přísun těchto látek do svého těla. Pokud se nemůžete vyhnout používání konzerv nebo nápojů v plechovkách, vždy si **vybírejte pouze nepoškozené výrobky na začátku doby expirace**.

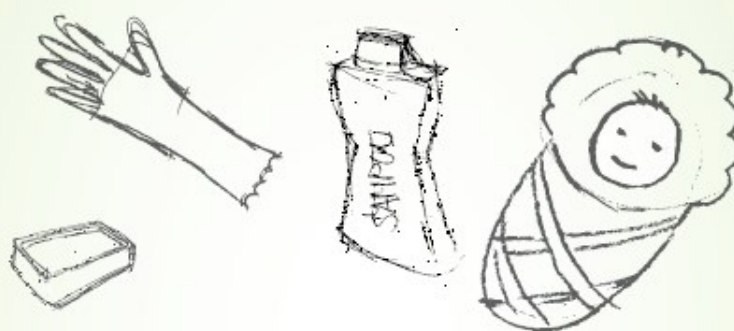
Jako **vhodnější obaly potravin nebo nápojů** lze doporučit např. **tetrapak nebo sklo**.

4. VŽDY KONZULTUJTE UŽÍVÁNÍ DOPLŇKŮ STRAVY S LÉKAŘEM

Vzhledem k prudkému rozvoji prodeje doplňků stravy prostřednictvím internetu se objevují i praktiky ohrožující spotřebitele. Některé doplňky stravy (využívané např. v alternativní medicíně) **mohou obsahovat až farmakologické koncentrace látek s endokrinní aktivitou** – např. díky obsahu koncentrova-

ných bylinných výtažků. U některých doplňků stravy pro sportovce byl zjištěn i obsah **syntetických steroidních látek**. Doplňky stravy mohou být v rozporu s předpisy opatřeny neschválenými zdravotními nebo „léčebnými“ tvrzeními.

Dobrym zdrojem informací o rizikových internetových stránkách je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) a její služba „**Rizikové weby**“ či „**Potraviny na praní**“ (dostupné i jako mobilní aplikace), a dále příručky „Nakupování na internetu“ nebo „Jak nakupovat potraviny na internetu“. Cílem je varovat spotřebitele před riziky nákupu na některých webových stránkách, např. pokud jejich provozovatel sídlí mimo EU, kde mají dozorové orgány velmi omezenou možnost vymáhat dodržování práva a kde může mít takový nákup pro spotřebitele negativní finanční nebo dokonce zdravotní dopady.



5.

VYBÍREJTE ZODPOVĚDNĚ KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY A ČISTICÍ PROSTŘEDKY

Na všech kosmetických přípravcích musí být uvedeno **složení výrobku s výčtem složek** v pořadí dle klesající koncentrace. Používání čisticích přípravků, pracích prostředků a kosmetiky je příjemnější, pokud obsahují vůni. Vonné složky obsahují např. svíčky, pytle na odpad, plenky, dámské vložky, papírové ubrousky. Funkce výrobku (čisticí, prací, kosmetická) je obvykle na vonné složce nezávislá, proto nejsou vonné složky ve spotřebních výrobcích nezbytné.

Nepravděpodobnější reakcí, kterou mohou složky čisticích a pracích prostředků nebo kosmetických přípravků vyvolat, je **alergická reakce**. U některých vonných nebo antimikrobiálních látek však byly zjištěny různorodé účinky, a to i **endokrinní aktivita**.

Zejména v citlivých obdobích vývoje je vhodné vybírat přípravky s minimem vonných složek a více se zaměřit na využití přírodních čisticích prostředků, jako je jedlá soda, roztok octa apod. Na trhu je množství kosmetických přípravků určených pro děti.

Vybírejte vždy osvědčené značky přípravků a čtěte informace uvedené na obalu. Oblíbené je využívání různých typů přípravků s obsahem (esenciálních) olejů pro masáže kojenců, které však **mohou obsahovat silně aktivní přírodní nebo syntetické složky**. Konzultujte používání kosmetických přípravků, zejména

typu tělová mléka, masti, krémy, oleje, opalovací přípravky apod. s dětským lékařem.

Nepoužívejte kosmetiku ani čisticí přípravky typu aerosolů nebo sprejů v přítomnosti malých dětí.

6.

MYJTE SI RUCI A POUŽÍVEJTE OCHRANNÉ PROSTŘEDKY

V mnoha výrobcích, s nimiž jsme denně v kontaktu např. v zaměstnání, při úklidu, zahradničení, výtvarných pracích nebo kutilství se nacházejí **látky schopné prostopovat skrze kůži nebo dýchací systém do krve a reagovat s endokrinním systémem**. Používání ochranných rukavic je naprostou nutností. Nutné je také **větrat prostory**, zejména při používání např. vonných látek, aerosolů, sprejů, lepidel, tmelů, barev, laků, nátěrů apod.

Velký význam má také umývání rukou. Např. **účtenky jsou vyrobeny z termopapíru**, jehož povrch je **potážen plastovou vrstvou obsahující látky typu bisfenolů**. Mytím rukou odstraníme mnoho látek, které ulpěly na kůži a mohly by kontaminovat např. stravu.

V běžném životě je vhodné používat **mýdla s minimálním obsahem vonných složek a bez antibakteriálních přísad**. Mýdlo samo o sobě má v běžném životě dostatečný čisticí účinek. Antibakteriální složky mají své opodstatnění zejména tam, kde dochází ke zvýšené možnosti kontaminace choroboplodnými mikroorganismy (např. ve zdravotnictví, potravinářských provozech, zemědělství).



7.

ZBAVUJTE DOMÁCNOST PRACHU A VĚTREJTE

Koncentrace chemických látek ve vnitřím prostředí budov (zejména zateplených, utěsněných a nevětraných) jsou vyšší než ve vnějším prostředí. **V mnoha materiálech nebo výrobcích**, přítomných v domácnostech, **mohou být obsaženy látky narušující endokrinní systém**, např. chemické látky zpomalující hoření ze stavebních materiálů, tkanin, plastů či elektroniky. Výzkum naznačuje, že **chemické látky ulpívají na částicích prachu**. Úklid zaměřený na **mokrý odstraňování prachu** z povrchů v domácnosti a účinné vysávání s použitím **HEPA filtrů** sniží v množství prachových částic i chemických látek na ně navázaných.

8.

NEKUŘTE

Alkaloid nikotin, obsažený v tabáku, je **psychoaktivní látka** s povzbuzujícími účinky, o níž je známo, že rychle vyvolává silnou závislost. **Ovlivňuje také (neuro)endokrinní systém.** Váže se na receptory ve vegetativním nervovém systému, čímž vyvolává zvýšenou aktivitu trávicího traktu, hladké svaloviny, zvyšuje krevní tlak, zrychluje činnost srdce, stahuje cévy, zvyšuje obsah mastných kyselin v krvi, blokuje syntézu estrogenu, zvyšuje produkci potu, ovlivňuje stažení zornic a posiluje syntézu endorfinů. **V cigaretovém kouři je obsaženo tisíce chemikálií**, přičemž u desítek z nich je již prokázáno, že mají **souvislost s rozvojem onkologických onemocnění** a mají schopnost reagovat i s endokrinním systémem.

**9.**

PREFERUJTE POHYB NA ČERSTVÉM VZDUCHU A OMEZTE POBYT V MÍSTNOSTECH NEBO AUTOMOBILECH

Výzkum naznačuje, že koncentrace některých látek s endokrinní aktivitou jsou vyšší ve vnitřním prostředí **zejména nově kolaudovaných nebo rekonstruovaných budov a uvnitř automobilů.** Pobyt na čerstvém vzduchu, dostatečné větrání, omezování pobytu ve vnitřních nevětraných prostorách a dopravních prostředcích může snižovat expozici některých látek s endokrinní aktivitou (např. formaldehydu, těkavých látek, ftalátů).

10.

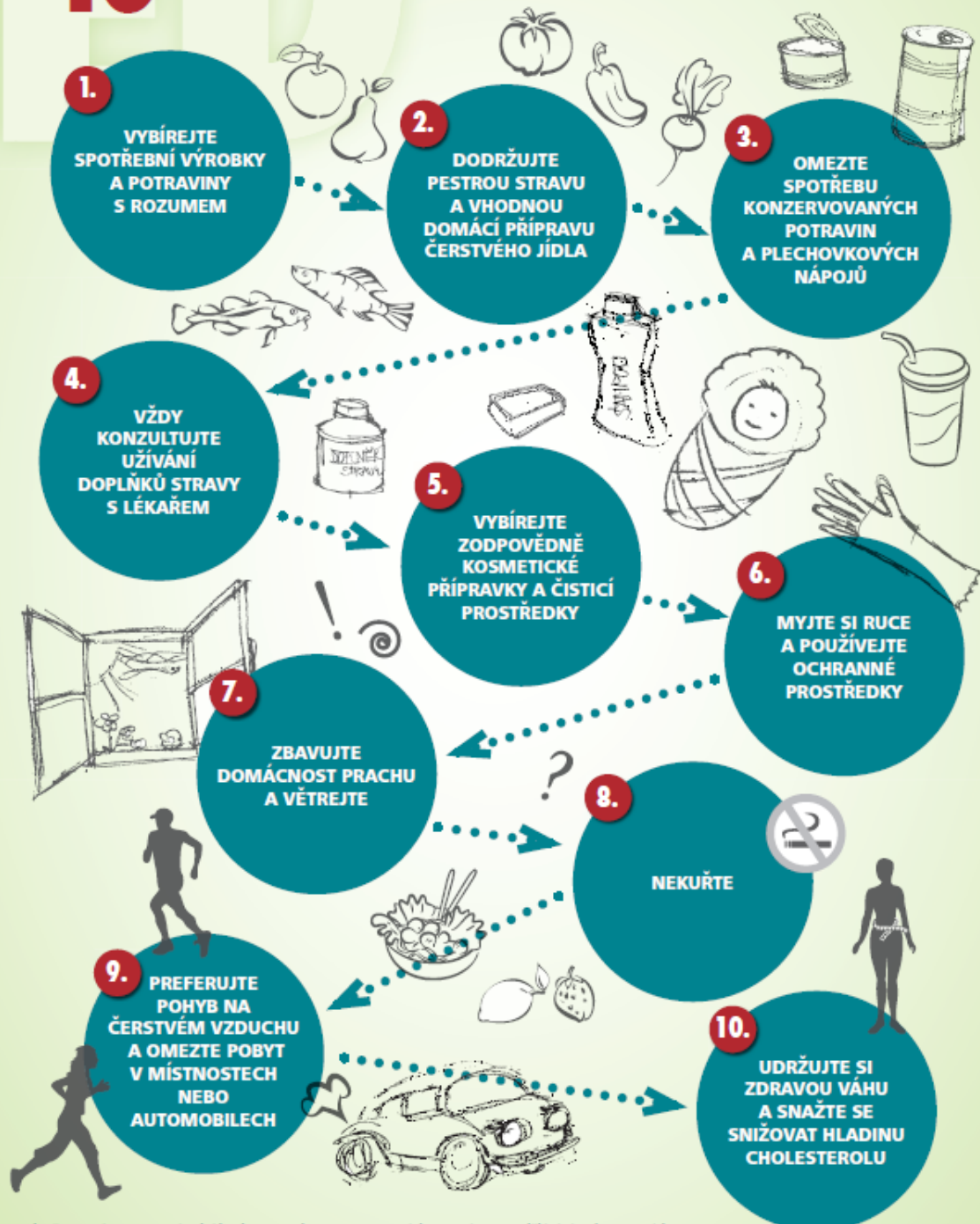
UDRŽUJTE SI ZDRAVOU VÁHU A SNAŽTE SE SNIŽOVAT HLADINU CHOLESTEROLU

Mnoho látek s endokrinní aktivitou je těžce odbouratelných a jsou rozpustné v tucích. Mohou se **kumulovat v tukových kapénkách**, které jsou deponovány v buňkách tukové tkáně nebo se **zpětně uvolňovat.** Údaje z výzkumu potvrzují, že **výskyt chemických látek v tukové tkáni se zvyšuje s věkem a trváním obezity.** Pokud se tedy zbavujete obezity či nadváhy, můžete se pravděpodobně zbavovat též znečišťujících látek, dlouhodobě deponovaných ve vaší tukové tkáni. **Hubnutí většího počtu kilogramů vždy konzultujte s lékařem.**

Podpořeno v rámci „Mezinárodní konkurenceschopnost SZU ve výzkumu, vývoji a vzdělávání v alternativních toxikologických metodách“, reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000860, financovaného z EFRR/ESF.

ENDOKRINNÍ DISRUPTORY

10 RAD JAK SE PŘED NIMI CHRÁNIT



Podpořeno v rámci „Mezinárodní konkurenceschopnost SZU ve výzkumu, vývoji a vzdělávání v alternativních toxikologických metodách“, reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000860, financovaného z EFRR/ESF.

© 2020, Právník 2019 • Design © Daniela A102

8. Diskuse

8.1. Predikce potenciálních ligandů estrogenového receptoru *in silico*

Námi dosažené výsledky metodou *in silico* predikovaly všechny látky typu ftalátů jako neinteragující s estrogenovým receptorem, přičemž všechny látky ze skupiny bisfenolů byly predikovány jako velmi silné ligandy (metodika je popsána v části 6.). Je třeba zdůraznit, že v současné době neexistuje závazný postup, jak hodnotit potenciál látek v *in vitro* studiích detekujících potenciál endokrinní disrupce a uvedená kategorizace endokrinní aktivity v tabulce 10. (+, ++, +++) byla provedena pouze pro zpřesnění experimentálních výsledků v této práci.

In silico predikce tedy nekoreluje zcela přesně s *in vitro* výsledky, když u některých ftalátů byla zjištěna agonistická aktivita vůči estrogenovému receptoru (benzyl butyl ftalát (BBP), dibutyl ftalát (DBP), diisobutyl ftalát (DIBP)) a u bisfenolu FL (BPFL) naopak velmi nízká až negativní agonistická aktivita. Důvodů, proč se *in silico* predikce nemusí vždy zcela přesně shodovat s laboratorními výsledky je několik. *In silico* predikce může být ovlivněna především obsahem dat z databází, které daný *in silico* nástroj využívá, a také specifikací účinků v algoritmu predikce. Specifikace účinku pro vazbu na estrogenový receptor byla pro OECD QSAR Toolbox původně vytvořena na základě nástroje “rtER Expert System ver.1 – USEPA profiler”, který obsahoval molekulární definice o strukturních charakteristikách chemických skupin uvedených jako potenciální ligandy estrogenového receptoru systémem US EPA Estrogen Receptor Expert System (ERES), což je automatický systém využívaný k predikci afinity látek k estrogenovému receptoru, využívající data *in vitro* i *in vivo*. ERES byl původně navržen pro regulační účely, zejména pro prioritizaci chemických látek (např. pesticidy nebo antimikrobiální látky typu pesticidů), tj. nezahrnuje chemické látky s chemickou strukturou podobnou steroidům. Tento systém byl vytvořen na základě zkušební sady chemických látek (soubor TrSet), v kombinaci s *in vitro* zkouškami, specificky optimalizovanými pro zachycení jakékoli indikace vazby, aby se co nejvíce zvýšila spolehlivost negativních výsledků. Přístup založený na chemických skupinách byl navržen tak, aby umožnil extrapolaci dat z omezeného počtu dobře charakterizovaných chemických látek (soubor TrSet) na širokou nespécifickou množinu, s využitím navržených chemických kategorií založených na koncepci analogických sloučenin. ERES je vlastně logický rozhodovací strom, založený na pravidlech, kódujících mechanistické účinky, chemické a biologické aspekty. Látky, které nesplňovaly definované hranice pro možnost predikce byly v rámci vývoje ERES považovány za látky s „neznámým vazebným potenciálem“ (UnkBP). Automatizovaná verze ERES tedy umožňuje porovnávat konkrétní chemickou látku se souborem látek (TrSet) v rámci chemické skupiny (tj. uzlu rozhodovacího stromu). Expertní systém rtER ver.1 - profilátor USEPA, jehož data využívá OECD QSAR Toolbox, může tedy zajišťovat predikci za účelem kategorizace a seskupování, a nikoli pro zcela přesnou predikci relativní vazebné afinity konkrétní látky k estrogenovému receptoru (OECD 2017).

Dalším důvodem je specifická toxicita účinku. OECD QSAR Project byl zahájen za účelem identifikace vlastností chemických látek a jejich seskupování (OECD 2007) a obsahuje data o různých typech toxicity. Do současné doby bylo u lidí popsáno více než 50 jaderných receptorů a řada dalších není popsána dostatečně - např. z hlediska afinity látek, které jsou schopné s nimi interagovat. OECD QSAR Toolbox nicméně nerozlišuje, na který typ estrogenového receptoru (např. α nebo β) je predikce specifická. *In vitro* biologický systém, odvozený z lidských buněk

(např. buněčné linie uvedené v OECD TG 455), např. exprimuje jak estrogenový receptor α , tak v menší míře estrogenový receptor β . *In vivo* exprese různých typů estrogenových receptorů je však tkáňově specifická, a *in vivo* data mohou být založena na interakcích s různými typy estrogenového receptoru. Vazba konkrétní chemické látky může být specifická pro konkrétní typ receptoru, proto může docházet při porovnání *in silico* predikce s výsledky specifického *in vitro* systému k odchylkám u konkrétních látek. OECD QSAR Toolbox nicméně jako jeden z mála veřejně dostupných a pokročile validovaných *in silico* nástrojů *in silico* predikci interakce s estrogenovým receptorem umožňuje a nová verze OECD QSAR Toolboxu (v.4 z roku 2017) nabízí i další možnosti predikce, např. interakce s proteiny nebo s receptorem kyseliny retinové, které mohou být taktéž využity v kombinaci s vhodnými *in vitro* metodami pro rozšíření predikce endokrinní aktivity. Bohužel, veřejně dostupný *in silico* nástroj, který by umožňoval predikci interakce s androgenovým receptorem nebyl do současné doby validován, proto taková predikce v rámci této práce nebyla provedena.

Na základě naší zkušenosti se nástroj OECD QSAR Toolbox jeví jako velmi vhodný k využívání při aktivitách primární prevence v oblasti toxikologie a farmakologie. Zjednodušeně řečeno, informace poskytnutá pomocí nástroje OECD QSAR Toolbox např. potvrdí, že určitá chemická látka dle chemické struktury, molekulární hmotnosti a rozdělovacího koeficientu oktanol - voda “může patřit do skupiny velmi silných ligandů” či do skupiny “nevázajících se látek”. Taková informace je velmi cenná pro směřování dalšího výzkumu. Je třeba vždy posuzovat, zda konkrétní strukturální charakteristiky nemohou zvyšovat biologickou aktivitu molekuly. Dle předchozích pozorování vykazují endokrinní aktivitu např. látky obsahující fenolické skupiny v para orientaci, s navázanými silně reaktivními hydroxylovými skupinami. Záměna vodíků v methylové skupině za halogeny (např. v případě BPAF) či počet a poloha reaktivních substituentů může však ovlivnit elektronovou hustotu na aromatickém jádře a tím i biologickou aktivitu. Na základě dlouhodobě sledovaných dat o souvislostech chemické struktury látek a jejich aktivity je možno vyvíjet analogické sloučeniny s žádoucí nižší toxicitou (Coleman et al. 2003) nebo naopak farmakologickými účinky. Obě možnosti jsou klíčové pro aktivity biomedicínského výzkumu. *In silico* nástroje v kombinaci s *in vitro* metodami se v budoucnu mohou stát efektivními přístupy pro identifikaci příčin toxikologických vlastností látek a předpokladů jejich biologického účinku. Získaná data mohou být využita v oborech toxikologie, chemie, biochemie, farmakologie, ale také v rámci směřování aktivit v oborech preventivní medicíny s přesahem do primární prevence a ochrany veřejného zdraví.

8.2. Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u vybraných látek se zdravotním rizikem, používaných ve spotřebních výrobcích

S pomocí pěti *in vitro* metod byl v rámci experimentální práce stanoven endokrinní potenciál látek ze skupiny bisfenolů a ftalátů, který indikuje možné narušení steroidní signalizace.

U látek ze skupiny bisfenolů byla zjištěna častá estrogenní, anti-estrogenní a anti-androgenní aktivita. Androgenní aktivita byla zjištěna jen jako velmi slabá, a to u látek bisfenol FL (BPFL) a bisfenol Z (BPZ) (viz tabulka 10.) U látek ze skupiny ftalátů byla zjištěna nejsilnější estrogenní aktivita u benzyl butyl ftalátu (BBP) a slabší estrogenní aktivita u dibutyl ftalátu (DBP) a diisobutyl ftalátu (DIBP). Anti-estrogenní aktivita byla zjištěna u dibutyl ftalátu (DBP) a slabá anti-androgenní

aktivita u Bis-(2-ethylhexyl)ftalátu (DEHP), benzyl butyl ftalátu (BBP), dibutyl ftalátu (DBP) a diisobutyl ftalátu (DIBP). Androgenní aktivita nebyla zjištěna u žádné látky ze skupiny ftalátů. Diethyl ftalát (DEP), diisononyl ftalátu (DINP) a diisodecyl ftalát (DIDP) vykazovaly negativní aktivitu za využití všech *in vitro* metod.

Jak vyplývá z tabulky 10., mezi jednotlivými *in vitro* metodami se ve výsledcích mohou objevit rozdíly, zejména u látek s nízkou aktivitou, kdy za použití metody OECD TG 455 vykazovaly některé látky velmi slabou aktivitu, přičemž za použití metody YES bylo dosaženo negativních výsledků (např. v případě dibutyl ftalátu DBP, diisobutyl ftalátu DIBP). Odchytky ve stanovení v rámci jedné metody nebo i mezi jednotlivými typy metod se mohou vyskytnout zejména v síle odezvy. Mohou být způsobeny více faktory (např. rozpustnost látky, prostupnost skrze membránu do buňky, úroveň exprese endogenních receptorů, rozdíly v konkrétních exprimovaných genech (např. pro více typů nebo isoform receptorů), zkřížené ovlivnění signálních drah u lidských buněk, mírný typ cytotoxicity, ovlivnění aktivity enzymu sekretovaného do média vzorkem, atd.). Je vhodné používat více koncentrací vzorku, referenční materiály, negativní kontrolu (např. typu čistého růstového média s buňkami, čistého růstového média bez buněk, atd.) a vhodná rozpouštědla (polární či nepolární, ideálně co nejbližší očekávanému způsobu použití testovaného materiálu), která umožní získání maximálních požadovaných informací o chování látky v praxi. Mezi základní přístupy patří zajištění sterility při experimentech a co nejspolehlivější postupy preanalytické fáze – tj. přípravy vzorku. Všechny metody (*in vitro* i *in vivo*) mají různé výhody, ale i limitace. Vzhledem k odlišným biologickým systémům (např. odlišná exprese genů pro endogenní receptory u buněk VM7Luc4E2 exprimujících estrogenový receptor α i β a u kvasinkového kmene exprimujícího pouze estrogenový receptor α (Ikeda et al. 2002) nebo variabilita v transportních mechanismech či přítomnost buněčné stěny u kvasinek) může docházet k drobným odchylkám, nicméně z výsledků uvedených v tabulce 10. vyplývá, že v rámci skupiny látek jsou nově zavedené *in vitro* metody spolehlivým nástrojem pro stanovení (ne)bezpečnosti za laboratorních podmínek. Metody zavedené v rámci tohoto doktorského projektu prokazují velmi uspokojivou sensitivitu, kdy jsou schopny odhalit aktivitu i velmi nízkých koncentrací testovaných látek a prokazují i dobrou srovnatelnost výsledků. Potvrdilo se, že je vhodné využívat více biologických systémů a kombinovat *in vitro* zkoušky sledující více mechanismů účinku (např. agonismus, antagonismus nebo i aditivní, potencující či synergické účinky), přestože jejich výsledky se u konkrétních látek nemusí zcela shodovat (zejména v případě slabých interakcí). Kombinací více výsledků získaných *in vitro* lze však zvýšit spolehlivost stanovení celkového potenciálu endokrinní disrupce. Metody založené na buněčných liniích odvozených od lidských tkání mají vysokou relevanci pro člověka. Rovněž metody založené na kvasinkách *S. cerevisiae* jsou široce využívány v biomedicinském výzkumu. U obou systémů je nejdůležitější důkladně monitorovat cytotoxické účinky. Přítomnost buněčné stěny sice zvyšuje odolnost kvasinkových buněk a má nepochybný vliv na transport (případně exkreci) látek do / z intracelulárního prostoru, avšak kvasinkové buňky mohou být citlivější vůči látkám s fungicidní aktivitou, což se prokázalo např. u bisfenolu G, M a FL, které bylo možné testovat metodami založenými na *S. cerevisiae* pouze do koncentrace 10^{-5} mol/l. Je známo, že kvasinkové buňky produkují amoniak jako signální molekulu signalizující stres, avšak k tomu dochází až při dlouhodobé inkubaci a např. při vyčerpání živin, proto výsledky krátkodobých experimentů u metod typu YES, YAS nemohou být touto vlastností ovlivněny, pokud se vždy ke každému experimentu používá čerstvá a viabilní kultura. Velkou výhodou kvasinkových buněk je absence přirozených komplexních systémů genové

regulace člověka, zajišťující eliminaci zkřížených signálních interakcí a umožňující detekci pouze jednoho typu receptorové signalizace (vazbu na receptor). Na místě je doporučení využívat kombinace *in vitro* metod pro stanovení jakéhokoliv typu systémové toxicity, tedy i endokrinního potenciálu, např. více biologických systémů a agonistických i antagonistických variant, aby mohla být posouzena celková endokrinní aktivita vzorků, zachycující více receptorů a mechanismů účinku, které potenciál endokrinní disrupce zahrnuje.

Předpokládá se, že nově vyvíjené analogické chemické látky, které se stávají snadno dostupnými na trhu, mohou sloužit jako náhrady již látek regulovaných - např. právě BPA v termotiskovém papíru (Goldinger et al. 2015, Liao et al. 2012). Naše výsledky se shodují s podobně zaměřenými studii, sledujícími mechanismy účinku např. u různých bisfenolů (analogů bisfenolu A) na více typů receptorů. Účinky strukturálních analogů na lidské receptory, podobné účinkům bisfenolu A, byly popsány v nedávných studiích (Roelofs et al. 2015; Eladak et al. 2015). Molina-Molina et al. zjistili, že analogy bisfenolu A (BPS, BPF a BPA) vykazují různě silnou aktivitu vůči různým typům estrogenového receptoru a jsou schopny interagovat i s androgenovým receptorem nebo pregnanovým X receptorem. Jejich výsledky taktéž naznačují, že BPA kongenery a deriváty mohou narušovat signalizaci u více typů receptorů a skrze receptorovou signalizaci interferovat s endokrinním systémem (Molina-Molina et al. 2013). Bisfenol A je zakázán v kosmetických přípravcích, dále byl regulován v materiálech pro styk s potravinami v několika zemích EU a stále probíhají projekty přehodnocující předchozí stanovení zdravotních limitů. Výsledky naznačují, že strukturální analogy bisfenolu A, a to látky bisfenol F a bisfenol S, nevykazují vlastnosti, na jejichž základě by mohly být bezpečnějšími alternativami ve srovnání s BPA, pokud jde o jejich endokrinní aktivitu. Bylo popsáno, že BPS je používán jako alternativa BPA, např. v termotiskovém papíru „BPA-free“ BPF byl nalezen v některých potravinách a BPS ve vzorcích moči (Liao et al. 2012; Liao & Kannan 2013; Liao & Kannan 2014). Účinky různých analogických látek, např. ze skupiny bisfenolů a ftalátů, by měly být považovány za relevantní z hlediska celkové expozice člověka.

Námi zavedené *in vitro* metody založené na *S. cerevisiae* byly využity i k testování ftalátů a získaná data jsou rovněž v korelaci s *in vitro* studii sledujícími endokrinní aktivitu ftalátů, kdy nejsilnější interakce s estrogenním receptorem byly pozorovány u benzyl butyl ftalátu (BBP), následně u dibutyl ftalátu (DBP), diisobutyl ftalátu (DIBP), diethyl ftalátu a diisononyl ftalátu (Harris et al. 1997). V následné analýze 96 vzorků moči jsme zjistili vysokou četnost pozitivních vzorků i vysoké koncentrace metabolitů ftalátů. Rovněž u metabolitů ftalátů bylo nedávno zjištěno, že vykazují antagonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α a androgenovému receptoru (resp. mono ethylhexyl ftalát – MEHP) (Da-Hye et al. 2019). Vzhledem k tomu, že expozice ftalátům je kontinuální, jak potvrdily i naše výsledky ze sledování efektivity intervenčních opatření, kdy jsme odebrali celkem 10 vzorků moči v definovaných časech v průběhu 4 dnů (viz tabulka 7. Harmonogram, čas odběru a označení odběrů moči), mohou ftaláty působit současně se svými metabolity. Některé ftaláty byly zakázány jako přísady kosmetických přípravků a regulovány v materiálech pro styk s potravinami. Chemické látky se ve spotřebních výrobcích vždy vyskytují ve směsích a mohou vykazovat biologické účinky, které jsou výsledkem jejich společného působení. Díky nově zavedeným *in vitro* metodám bude možné sledovat biologický účinek např. definovaných směsí chemických látek a také komplexních směsí o neznámém složení, např. extraktů spotřebních výrobků. Sledování toxicity komplexních směsí o neznámém složení *in vitro* metodami je v současné době v počátcích, ale stává se velmi aktuálním tématem. Bohužel zatím

není k dispozici dostatek dat ani ověřených postupů. Situace se však dynamicky vyvíjí a jsou definována doporučení, jak k hodnocení bezpečnosti směsí a předpokládaných kombinovaných účinků přistupovat (Hernández et al. 2017; SCHER, SCCS, SCENIHR 2012, Kortenkamp et al. 2009, Orton et al. 2011).

8.3. Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru, plastu, kosmetických přípravků a doplňků stravy

Nově zavedené metody založené na kvasinkách *S. cerevisiae* se osvědčily při testování chemických látek. Buňky *S. cerevisiae* vykazují dobrou toleranci např. vůči vyšším koncentracím ethylalkoholu, olejům, solím a změnám osmotického prostředí i pH, proto lze předpokládat, že budou vhodným biologickým systémem pro testování komplexních směsí o neznámém složení. S ohledem na výše uvedené vlastnosti *S. cerevisiae* byly nově zavedené *in vitro* metody (YES, anti YES, YAS, anti YAS) optimalizovány pro širší využití, a to pro detekci endokrinního potenciálu extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru, plastu a dále extraktů kosmetických přípravků a doplňků stravy. Výsledky experimentů jsou uvedeny v části 7. Výsledky, kapitola 7.4.- 7.7.

U mnoha extraktů spotřebních výrobků rozpuštěných v DMSO byl v laboratorních podmínkách zjištěn potenciál endokrinní aktivity, a to v tomto pořadí: anti-androgenní a anti-estrogenní aktivita u nejvíce typů vzorků (vzorky na bázi papíru, plastů, kosmetické přípravky, doplňky stravy), silná estrogenní aktivita (2 vzorky doplňků stravy ze sortimentu tradiční čínské medicíny), androgenní aktivita (1 vzorek na bázi papíru s černým potiskem). Zajímavým výsledkem byla androgenní aktivita zjištěná u vzorku ubrousku s černým potiskem (materiálu přicházejícího do styku s potravinami), kdy při následné identifikaci pomocí chemické analýzy byly zjištěny i zvýšené koncentrace některých chemických látek (Kejlová et al. 2019). Zajímavým také bylo zjištění, že doplňky stravy ze sortimentu tradiční čínské medicíny mohou vykazovat značně variabilní výsledky – a to zcela negativní endokrinní aktivitu, nebo naopak silně pozitivní agonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α , dosahující až farmakologických hodnot (viz graf 12). Silnou estrogenní aktivitu vykazoval vzorek č. 6 extraktu z houby Housenice čínské (*Cordyceps sinensis*), která je uváděna jako bohatý zdroj fytoestrogenů (Zhang et al. 2014). Vzorek č. 3 byla směs extraktů z více bylin, proto silný estrogenní účinek je výsledkem kombinovaných účinků neidentifikovaných látek v extraktu. V poslední dekádě roste obliba doplňků stravy ze sortimentu tradiční čínské medicíny, zřejmě pro přesvědčení, že jde o přírodní, přirozenou a dlouhodobě osvědčenou léčbu, kontrolovanou ze strany dozorových orgánů. Z valné většiny jde však o doplňky stravy, které neprocházejí klinickými studiemi pro posouzení indikace, kontraindikace, kvality a dávkování pro jednotlivé skupiny obyvatelstva, ani schválením Státního úřadu pro kontrolu léčiv. U doplňků stravy může docházet k nedostatku informací o složení, např. o účinných látkách. Organizovaná kontrola, zda výrobek neobsahuje jiné látky, než deklaruje, či zda obsahuje jejich deklarované množství, není v současné době prováděna. To zdůrazňuje význam nově zavedených metod pro sledování potenciálu endokrinní disrupce, které by v budoucnu mohly být využívány pro sledování endokrinního potenciálu finálních spotřebních výrobků.

Příkladem, který potvrdil dobrou specificitu metod, byl výsledek testování dvou typů parfémů, u nichž byl deklarován obsah feromonů, a které vykazovaly zcela shodnou anti-androgenní aktivitu, přestože jeden typ parfému byl deklarován jako dámský (s obsahem látky

Androstenol) a druhý jako pánský (s obsahem látky Androstenone). Androstenol je steroidní sloučenina náležející do skupiny vonných 16-androstenů (steroidních uhlovodíků), přítomná v kančích slinách, a také nalezená u lidí, s vlastnostmi podobnými feromonům, ale molekulární cíle jeho feromonální aktivity nejsou zcela objasněny. Androstenone je steroidní sloučenina, přítomná v kančích slinách a např. lanýžích. Byl identifikován jako první savčí feromon. Je účinnou látkou přípravku Boarmate (DuPont) určeného k načasování umělé inseminace u prasat. Při vdechování tohoto feromonu samice zaujímá postoj k páření. 2-(Androstenol (5 α -androst-2-en-17-ol); 2-Androstenone (5 α -androst-2-en-17-one) jsou uvedeny jako hormonální a metabolické modulátory a jsou na seznamu zakázaných látek Světové anti-dopingové agentury (https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2019_english_prohibited_list.pdf).

Zajímavé výsledky také přinesly experimenty se spotřebními výrobky na bázi plastu s předpokládanou dlouhodobou expozicí a kontaktem se sliznicí (Venušiny kuličky) a dalšími erotickými pomůckami. Erotické pomůcky vyrobené ze 100% silikonu nevykazovaly endokrinní aktivitu. V případě jednoho vzorku (Venušiny kuličky červené barvy, vyrobené z plastu ABS) byla zjištěna antagonistická aktivita vůči estrogenovému receptoru α a androgenovému receptoru (graf 4, graf 5). Všechny výrobky byly vyrobeny z barevného plastu, avšak v jejich složení nebyla deklarována žádná barviva. To zdůrazňuje výhodu zavedených *in vitro* metod, které jsou schopny odhalit biologický účinek finálního spotřebního výrobku, přestože v deklarovaném složení nemusí být uvedeny všechny složky. Na základě předběžného stanovení potenciálu endokrinní disrupce u spotřebních výrobků může být zvolen další typ analýzy, směřující k identifikaci látek, které se mohou podílet na biologickém účinku.

Neméně zajímavými byly výsledky ze sledování potenciálu endokrinní disrupce kosmetických přípravků různého složení. Byly vybrány kosmetické přípravky s předpokládaným obsahem fytoaktivních látek, z nichž byly připraveny extrakty (viz tabulka 13.). U výrobku "Hemp elixír" olejové konzistence s obsahem konopí byl extrakt připraven jako nejkoncentrovanější (ředěním původního výrobku 9:1 v DMSO na pracovní extrakt). Tento vzorek následně vykazoval nejsilnější antagonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α i androgenovému receptoru. Taktéž ostatní kosmetické přípravky v laboratorních podmínkách vykazovaly stejný typ aktivity, avšak slabší odezvu (graf 6., graf 7.).

Experimenty se spotřebními výrobky byly vedeny tak, aby bylo možno dosáhnout standardního postupu pro co nejširší škálu vzorků, a zároveň aby bylo možno získávat a porovnávat výsledky ve srovnatelných koncentracích extraktů mezi jednotlivými skupinami spotřebních výrobků. Velmi podstatnou částí experimentální práce byla příprava extraktů, kdy bylo nutno zajistit dostatečnou sterilitu bez poškození vzorku, protože vzorky samy o sobě sterilní nebyly. Zpočátku byly testovány různé typy extraktantů (např. fyziologický roztok, ethanol, voda, médium, DMSO) a sterilizační metody (oplach EtOH, sonifikace, autoklávování, filtrace extraktu). Po těchto počátečních experimentech se dimethylsulfoxid (DMSO) ukázal být nejvhodnějším typem rozpouštědla, což je též v souladu s doporučeními uvedenými v instrukcích pro provádění metody (Xenometrix 2015, Xenometrix 2017). Dimethylsulfoxid (DMSO) je organosírová sloučenina, která jako aprotické polární rozpouštědlo rozpouští polární i nepolární sloučeniny a umožňuje dosáhnout maximální extrakce látek z testovaného materiálu. Je také účinným kryoprotektantem a do určité míry má samo-sterilizační účinek, který, jak se ukázalo, umožňuje testovat vzorky spotřebních výrobků po dobu až 48 hod, aniž by došlo k mikrobiální kontaminaci testovacího systému. Dalším

aspektem, který je třeba uvažovat, je variabilita biodostupnosti v experimentech sledujících aktivitu komplexních směsí mnoha neznámých složek, kterými extrakty jsou. Některé ligandy receptorů jsou hydrofilní molekuly, které nemohou samostatně procházet buněčnou membránou a využívají proto např. transportní membránové proteiny. Látky lipofilní mohou plazmatickou membránou prostupovat. Informace, jak molekula DMSO moduluje strukturu a funkci membrán jsou významné z hlediska možnosti zvýšení či snížení absorpce biologicky aktivních molekul, zejména do kůže nebo přes kůži. DMSO může indukovat aquaporiny v dipalmitoyl-fosfatidylcholinových dvojvrstvách a zvyšovat penetraci aktivních látek přes lipidové membrány. DMSO také způsobuje, že se membrána stane poddajnější, což může zvýšit membránovou permeabilitu, usnadňuje membránovou fúzi a umožňuje buněčné membráně přizpůsobit se osmotickému a mechanickému stresu (např. během kryokonzervace) (Notman et al. 2007). Vždy je třeba respektovat, že nejvyšší necytotoxická koncentrace tohoto rozpouštědla v médiu musí být 1%. Rozhodnutí o vhodném typu rozpouštědla samozřejmě ovlivnilo výsledky. Extrakt v DMSO obsahuje vyšší množství rozpuštěných polárních i nepolárních složek, než by tomu bylo např. u polárních rozpouštědel typu voda, fyziologický roztok, ethanol, médium nebo za přirozených podmínek. Pro stanovení bezpečnosti spotřebních výrobků *in vitro* je přínos výsledků za použití tohoto rozpouštědla hlavně ve spolehlivosti negativních výsledků. Výsledky za použití DMSO poskytují data o “přehnaném typu expozice” (tzv. “exaggerated exposure”). Při současném zhodnocení dat o biologické dostupnosti, migraci a absorpci je však i spolehlivost pozitivních výsledků v souladu s aktuálně uplatňovaným principem předběžné opatrnosti. U pozitivních výsledků je nutno uvažovat, že jich je dosaženo v laboratorních podmínkách, v nejvyšší koncentraci např. 1% extraktu v médiu, a dochází k interakci přímo s buněčnou membránou. Navíc, *in vitro* testovací systémy postrádají plně funkční metabolické a homeostatické mechanismy komplexního organismu. Na druhou stranu je třeba brát v úvahu mechanismy na buněčné úrovni, které jsou součástí homeostázy i na úrovni vyšší, orgánové – např. (mezi)buněčnou signalizaci a jí ovlivněné mechanismy endomembránového systému, transmembránový transport a systém buněčného vezikulárního transportu, jako je buněčná exkrece a exocytóza. Výsledky ze sledování potenciálu endokrinní disrupce u chemických látek i extraktů spotřebních výrobků v mnoha případech potvrzují vícenásobné interakce látek s receptory a naznačují, že identifikace potenciálu endokrinní disrupce je spolehlivější, pokud jsou k dispozici výsledky jak z agonistických, tak antagonistických studií. Je tak možno zachytit paralelní interakce látek s receptory estrogenů a androgenů a zjistit celkový (anti)steroidní potenciál vzorku.

Pokud jde o testování komplexních směsí o neznámém složení, metody založené na *S. cerevisiae* se v našich experimentech osvědčily. Buňky *S. cerevisiae* jsou schopny dobře přežívat nejen rychlé změny osmotického tlaku, ale i vyšší koncentrace látek využívaných jako přísady kosmetických přípravků – např. ethanolu (letální dávka představuje zhruba 12–14 % objemu), acetaldehydu, kyseliny octové, oleyl alkoholu, glycerolu, methylesterů, mastných kyselin, olejů, některých stopových prvků (např. síry, hořčíku, zinku, mědi). Díky těmto vlastnostem se jeví kvasinky *S. cerevisiae* jako velmi vhodný biologický systém pro testování např. kosmetických přípravků nebo doplňků stravy. Varianty *in vitro* metod založené na kvasinkových buňkách (*Saccharomyces cerevisiae* nebo *Axula adenivorans*) byly v poslední době validovány v rámci systému ISO (ISO 2018) a metoda YES je již zahrnuta do koncepčního rámce OECD. Obě metody (YES, YAS) jsou považovány za obdobně spolehlivé jako transaktivační metody založené na savčích buňkách (OECD 2018).

V antagonistických studiích, kdy je v médiu přítomna vždy stabilní koncentrace

standardního přídatku silného ligandu (hormonu) je možno pozorovat, zejména u vzorků typu komplexních směsí (extraktů), odpověď indikující zesílení vazby hormonu přítomného v médiu jako standardní přídatek na receptor. Ve výsledcích se však nemusí vždy objevit koncentrační závislost odpovědi, neboť jde o kompetitivní antagonismus, kdy do interakcí s receptory vstupuje mnoho neznámých složek přítomných ve směsi. Ty se mohou vyznačovat různou afinitou v různých koncentracích a vykazovat i vzájemné interakce v rámci komplexu receptor-ligand. Výsledky z antagonistických studií, zejména u komplexních směsí, je třeba hodnotit v každé koncentraci jako unikátní časově a prostorově zachycenou situaci. Naše výsledky naznačují, že komplexní směs může v důsledku i podporovat (zesilovat) endokrinní signalizaci. Tento typ reakcí byl objasněn u směsí chemických látek o známém složení a pozorován jako aditivní, synergické, potencující nebo inhibující účinky (Seeger et al. 2016, Vejdovszky et al. 2016). Bohužel, vzhledem k tomu, že testování endokrinního potenciálu u komplexních směsí je novým aktuálním výzkumným tématem, publikací takto zaměřených teprve začíná přibývat a není k dispozici dostatek publikací podobně zaměřených. Některé studie však potvrzují, že nově vyvinuté *in vitro* metody lze využít pro testování nejen chemických látek, ale i jejich definovaných směsí, nebo směsí o neznámém složení, např. biologických vzorků (Sonneveld et al. 2005). *In vitro* studie jsou také doporučovány jako vhodné při studiu aditivních účinků směsí, např. anti-androgenních fungicidních látek (Seeger et al. 2016).

Obecně se předpokládá, že látky s pozitivními výsledky v systémech *in vitro* mají potenciál vyvolat nepříznivé účinky taktéž *in vivo*. Citlivé lidské populace by měly být instruovány, jak potenciálně snižovat expozici těmto znečišťujícím látkám, protože řadu z nich lze nalézt v mnoha spotřebních výrobcích a v životním prostředí (Liao et al. 2012; Liao & Kannan 2013; Chen et al. 2016, Dodson et al. 2012, Meeker JD 2012, Pirard et al. 2018, Bae & Hong. 2015, Brouwers et al. 2009, Brophy et al. 2012, Den Hond et al. 2015, Harley et al. 2016). Klíčovým úkolem primární prevence a ochrany veřejného zdraví je vypracování vhodných strategií pro sledování endokrinní aktivity nejen chemických látek, ale taktéž finálních spotřebních výrobků, např. pomocí monitoringu konkrétních prioritních látek vyskytujících se ve spotřebních výrobcích (chemické analýzy) nebo i detekcí biologických účinků přímo finálních spotřebních výrobků (např. materiálů přicházejících do styku s potravinami nebo spotřebních výrobků přicházejících do styku se sliznicí). Námi nově zavedené metody bude možné v budoucnu s výhodou využít pro stanovení potenciálu endokrinní disrupce, a přispět tak k definování preventivních opatření s cílem chránit zdraví zejména citlivých populací.

8.4. Stanovení prediktivních indikátorů expozice bisfenolům a ftalátům

Vzhledem k rozšíření látek s endokrinní aktivitou v prostředí je klíčovou aktivitou oborů preventivní medicíny sledovat expozici běžné populace těmto látkám. Proto jsme se zaměřili na detekci prediktivních indikátorů expozice bisfenolům a ftalátům. Výsledky této studie jsou uvedeny v části 7.8. a shrnuty v tabulce 15. Z analýzy 96 vzorků moči, archivovaných v roce 2015 v SZÚ, Centru toxikologie a zdravotní bezpečnosti byly nejčastěji a v nejvyšších koncentracích detekovány látky ze skupiny ftalátů: monoethyl ftalát (MEP), monobutyl ftalát (MnBP), monoisobutyl ftalát (MiBP). Jako nejčastěji detekovaná látka ze skupiny bisfenolů byl, jak jsme předpokládali, detekován bisfenol A (BPA), a to v koncentracích jednotek až stovek $\mu\text{g/g}$ kreatininu (nejvyšší hodnota byla 107,5 $\mu\text{g/g}$ Cr), a pouze ve 27 vzorcích z celkem 96. To naznačuje, že

desítky procent běžné populace mohou být exponovány bisfenolu A v nízkých koncentracích, přičemž, jak naznačují naše výsledky *in vitro*, může bisfenol A interagovat s estrogenovým nebo androgenovým receptorem v koncentracích od 10^{-6} mg/ml.

Jako prediktivní indikátory expozice bisfenolům a ftalátům lze využívat metabolity ftalátů s nejčastější četností detekce, tj. MEP, MnBP, MiBP a BPA. Tyto i další metabolity ftalátů byly již v nedávných studiích analyzovány a byl rovněž zjištěn jejich značně rozšířený výskyt u běžné populace (Černá et al. 2015). Zajímavým výsledkem jsou však i ojedinělé nálezy v nízkých koncentracích i dalších analogů ze skupiny bisfenolů (bisfenol S (BPS) – 1 x detekce, bisfenol F (BPF) – 3x detekce), které potvrzují, že tyto látky jsou ojediněle přítomné v prostředí. Důvodem může být počátek jejich využívání jako náhrady v různých aplikacích namísto regulovaného bisfenolu A. Námi dosažené výsledky ohledně aktivity analogů bisfenolu A se shodují s výsledky i dalších podobně zaměřených studií, tj. že bisfenol F i bisfenol S vykazují podobnou endokrinní aktivitu jako bisfenol A, proto nemohou být považovány za bezpečné náhrady (Le Fol et al. 2017, Roelofs et al. 2015; Eladak et al. 2015). Bisfenol S i bisfenol F, ale i další analogické sloučeniny (dle technologického vývoje a jejich využití ve spotřebních výrobcích) by proto také neměly chybět při monitorování expozice bisfenolům a ftalátům na větším vzorku populace. Výsledky naší studie jsou udávány v hodnotách 1 μg stanovované látky na 1 g kreatininu ($\mu\text{g}/\text{g Cr}$), neboť koncentraci látek v moči může ovlivnit to, jak je samotná odebraná moč koncentrovaná. Tvorba kreatininu v organismu i jeho vylučování močí v průběhu dne je poměrně konstantní a stanovení koncentrace kreatininu v moči lze s výhodou využít pro standardizaci eliminace látek močí v případě, že máme k dispozici jen jednorázový vzorek moči a sběr za 24 hodin není možné provést (24 hodinový odběr u většího vzorku populace naráží na praktické problémy s logistikou, organizací odběrů a skladováním). Stěžejní údaje o expozici běžné populace bisfenolu A v Evropě přinesl mezinárodní projekt DEMOCOPHES (Černá et al. 2015), na který by se dalo v budoucnu navázat, protože ČR se v rámci tohoto projektu účastnila sledování koncentrací ftalátů v moči, nikoliv však sledování BPA. Naše výsledky podporují závěry, že látky ze skupiny ftalátů a bisfenolů by měly být prioritizovány a zahrnuty do opakovaného sledování v rámci biomonitoringu. Pro zobecnění výsledků a extrapolaci dat na běžnou populaci, a za předpokladu zájmu ze strany regulačních orgánů, by bylo žádoucí provést opakovaný biomonitoring a návrh preventivních opatření v podobě aktualizace či zavedení zdravotně významných limitů. V teoretické rovině by bylo ideální v rámci sekundární prevence (kdy jde o zabránění rozvoje negativních faktorů pomocí včasné diagnostiky) dosáhnout např. stavu, kdy na základě velmi vysokých opakovaně detekovaných hodnot u individuálních stanovení (např. přesahujících percentil 95), by bylo možno navrhnout individuální preventivní přístupy (i v preklinické fázi) – např. doporučit preventivní endokrinologické vyšetření. Takový přístup, kdy by preventivní toxikologie přecházela do aplikované medicíny, zůstane zřejmě nereálnou představou s ohledem na vysoké náklady, přestože nevychází z nereálné podstaty: zajímavé a varovné v naší studii byly vysoké nálezy MEP (až $3318 \mu\text{g} / \text{g Cr}$) a MnBP (až $378,6 \mu\text{g} / \text{g Cr}$), které už by v těchto koncentracích pravděpodobně mohly při dlouhodobější expozici zatěžovat zejména eliminační mechanismy. MEP je metabolitem diethyl ftalátu (DEP) a jako jediný ze skupiny ftalátů je povolen jako přísada kosmetických přípravků, které mohou být jedním ze zdrojů této látky. Je však klasifikován jako ftalát s nízkou toxicitou a i v našich experimentech byla jeho aktivita vůči estrogenovému i androgenovému receptoru (pomocí metod OECD TG 455, YES a YAS) detekována jako negativní. Primární a stěžejní údaje o zátěži populace ČR ftaláty byly získány taktéž v mezinárodním projektu DEMOCOPHES, který porovnával expozici ftalátům v

několika zemích (Černá et al. 2015). Naše výsledky podporují zjištění, že výskyt ftalátů v moči běžné populace je signifikantní a může být spojen s rozdíly v životním stylu – např. stravovacími návyky nebo používáním spotřebních výrobků (např. kosmetických přípravků v případě výskytu MEP v moči). Zjistili jsme, že běžná populace je exponována ftalátům ve vysoké míře. Četnost negativních hodnot (<LOQ) byla velmi nízká a pohybovala se v jednotkách. U MEP byly zjištěny pouze 2 negativní vzorky z 96, a v případě MiBP a MnBP bylo všech 96 vzorků pozitivních. Nejvyšší dosažené hodnoty se pohybovaly ve stovkách (u MiBP, MnBP) až tisících (u MEP) $\mu\text{g/g Cr}$.

Monitorování výskytu chemických látek v biologických tekutinách člověka je preventivním přístupem, kdy snahou je získání podkladů pro případná preventivní opatření vedoucí ke snížení vlivu rizikových faktorů (snížení expozice chemickým látkám) a ke zvýšení protektivních faktorů (např. regulační opatření cílená na ochranu spotřebitele). Základní aktivitou je biologické monitorování na základě koncentrací analytů v biologických tekutinách člověka. Pro tento účel je moč často významným biologickým vzorkem, umožňujícím neinvazivní odběr a celou řadu analýz, což se potvrdilo i v rámci naší studie. Důležitým předpokladem je získání dostatečného počtu vzorků, na jejichž základě lze zjistit statisticky významný výsledek. Biologické monitorování souvisí vždy s dostupností co nejvíce reprezentativních vzorků, ale i analytických metod. Často se v reálné situaci přistupuje k monitorování těch látek, pro jejichž detekci jsou již zavedené spolehlivé analytické metody. Důležitým aspektem biologického monitorování je poměr nákladů na tyto aktivity a celkový přínos, kdy za ideálních podmínek by mělo být dosaženo efektivního vynaložení nákladů na získání takových výsledků, které umožní poskytnout relevantní podklady pro rozhodovací procesy v oblasti preventivních opatření. Pro preventivní aktivity typu biologického monitorování by bylo žádoucí získat silnější veřejnou podporu, a to na základě odborné argumentace podložené daty z pilotních studií biomedicínského výzkumu. Výsledky z biomedicínského výzkumu a biologického monitorování jsou velmi cennými a často unikátními daty, na jejichž základě lze navrhnout řadu preventivních aktivit, např. opakované biologické monitorování konkrétních látek v rámci státního dozoru a případné zavedení zdravotních limitů s cílem chránit veřejné zdraví a předcházet rozvoji negativních zdravotních účinků. Bohužel, minimum studií je zaměřeno na sledování efektivity intervenčních opatření nebo kontinuální expozice, proto jsme se s ohledem na dosud dosažené výsledky rozhodli provést doplňkovou studii na omezeném souboru dobrovolníků (viz níže bod 8.5.).

8.5. Sledování efektivity intervenčních opatření pro potenciální snížení expozice bisfenolům a ftalátům

S ohledem na vědecký vývoj a na základě zjištěných vysokých hodnot ftalátů a bisfenolu A ve studii 96 vzorků moči jsme se v další doplňkové studii pokusili o ověření výsledků z hlediska kontinuální expozice, studium cest expozice a ověření efektivity intervenčních opatření. Hypotézou bylo, že dietární expozice je relevantním faktorem ovlivňujícím celkovou expozici člověka, a proto vhodnými stravovacími návyky lze potenciálně snížit expozici. Sledovali jsme expozici bisfenolům a ftalátům po dobu 4 dnů. Studie byla navržena jako dvoufázová, kdy v první fázi (Fáze I) byla provedena intervence ke zvýšení expozice a v druhé fázi (Fáze II) ke snížení expozice. Jako zdroj bisfenolů a ftalátů ve stravě byly předpokládány zejména konzervované potraviny a nápoje v plechovkách (viz část metodika, bod 6.14.) a to proto, že bisfenol A nebo jeho

analogie mohou být přítomny v tenké plastové vrstvě na vnitřním povrchu konzerv a plechovek zabraňující korozi a kontaktu obsahu konzervy nebo plechovky s kovovým obalem (Tateoka 2015, Geens et al. 2011, Geens et al. 2012, Bae & Hong 2015, Hartle et al. 2016). Přítomnost ftalátů ve stravě byla spojována se skladováním, migrací z obalů nebo kontaminací při produkci, přičemž na základě informací z některých studií, že ftaláty (DnBP, DEHP) byly detekovány v tučných potravinách (mase, olejích, smetaně, sýrech) (Kappenstein et al. 2012, Serrano et al. 2014, Pereira et al. 2019), předpokládali jsme jejich možný obsah v tučnějších potravinách obsahujících např. rybí nebo vepřové maso a olej. Vzhledem k tomu, že konzervované výrobky obsahují často olej, tučné ryby a maso, bylo u ftalátů taktéž uvažováno, že při omezení příjmu vysoce zpracovaných konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách by mohl být pozorován pokles koncentrací ftalátů v moči nebo by mohla být ovlivněna četnost detekce pozitivních či negativních hodnot, jak naznačují i některé studie (Ji et al. 2010).

Námi dosažené výsledky indikují, že zvolená intervenční opatření (vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách) by mohla přispívat ke snížení expozice bisfenolu A. Koncentrace bisfenolů detekované v moči ve Fázi II studie byly nižší než ve Fázi I, kdy byla požadována konzumace zvýšená (viz část Výsledky, bod 7.10., grafy 31. – 36., tabulka 16., 17.). Celková absolutní četnost negativních hodnot u všech bisfenolů (<LOQ) ve Fázi I (163; 90,5 %) byla nižší než ve Fázi II (175; 97,2 %), tj. po intervenci se zvýšil počet negativních nálezů o 12; tj. 6,7 %. Celkový počet negativních hodnot u bisfenolů byl vyšší než u ftalátů (163 ze 180 ve Fázi I, 175 ze 180 ve Fázi II oproti 171 ze 420 ve Fázi I, 84 ze 420 ve Fázi II). Výsledky indikují, že bisfenolům je exponováno méně osob než ftalátům (což se potvrdilo i v předchozí studii na 96 vzorcích moči, kdy nálezy BPF a BPS byly ojedinělé a pouze 27 vzorků z 96 bylo pozitivních na BPA oproti ftalátům, kde byly negativní hodnoty nulové u MiBP a MnBP a byly zjištěny pouze 2 negativní vzorky u MEP). Koncentrace bisfenolů v moči jsou obvykle minimálně o jeden řád nižší než u ftalátů (jednotky až desítky $\mu\text{g/g Cr}$ u bisfenolů oproti desítkám až stovkám $\mu\text{g/g Cr}$ u ftalátů). Nejzajímavější rozdíly v četnosti detekce mezi oběma fázemi byly zjištěny u BPA. Absolutní četnost negativních hodnot (<LOQ) u BPA ve Fázi I byla 48 z 60, tj. 80 %, přičemž ve Fázi II (tj. při vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách) vzrostla absolutní četnost negativních hodnot na 56 negativních nálezů z celkového počtu 60 vzorků (na 93,3 %), tj. o 13 %. Zároveň byly zjištěny ve Fázi II nižší hodnoty (průměr všech hodnot, průměr pozitivních hodnot, geometrický průměr, medián, nejvyšší hodnota) oproti Fázi I (viz tabulka 16., 17.). Hodnoty u bisfenolu A se však nelišily řádově mezi oběma fázemi. Pohybovaly se stále v řádech jednotek až desítek $\mu\text{g/g Cr}$. Ojedinělou vysokou hodnotu u bisfenolu F (BPF, křivka 1001, Fáze I, graf 33.) - 100,79 $\mu\text{g/g Cr}$ lze vysvětlit kontaminací z pracovního prostředí (dobrovolník pracuje jako chemik). Dalším zajímavým výsledkem byla korelace hodnot u účastníků studie, kteří užívali stejnou domácnost (např. vyšší koncentrace BPA - křivka 1003, 1005, graf 31.). To zdůrazňuje význam prostředí i stravy při snižování expozice. Přestože naše studie byla pilotní a provedená na omezeném souboru dobrovolníků, lze na základě těchto předběžných výsledků předpokládat, že intervenční opatření (snížení konzumace konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách ve Fázi II) může být specifickým přístupem, přispívajícím ke snižování expozice bisfenolům. To potvrzují i další, avšak nepříliš četné studie, zaměřené rovněž na sledování efektivity intervenčních opatření v rámci ovlivnění stravy (Hartle et al. 2016, Rudel et al. 2011).

Bohužel, intervenční opatření (snížení konzumace konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách ve Fázi II) se ukázala jako nespecifická v případě ftalátů, když koncentrace ftalátů se

po intervenci nesnížily, ale naopak byly vyšší než ve Fázi I, kdy byla požadována konzumace zvýšená (viz část Výsledky, bod 7.10., grafy 17. – 30., tabulka 16., 17.). Celková absolutní četnost (<LOQ) negativních hodnot byla u ftalátů nižší než u bisfenolů (171 ze 420 ve Fázi I, 84 ze 420 ve Fázi II). Zároveň byly zjištěny ve Fázi II cca 2 x vyšší hodnoty (průměr všech hodnot, průměr pozitivních hodnot, geometrický průměr, medián). Hodnoty se řádově nelišily mezi oběma fázemi (desítky až stovky $\mu\text{g/g Cr}$). Vyšší koncentrace metabolitů di-ethylhexyl ftalátu (DEHP), tj. 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP, MEHP a dále vyšší koncentrace MiBP a BPA byly zjištěny u účastníků studie užívajících stejnou domácnost (křivka 1001, 1002, graf 20., 24., 26., 30., 32.). Námi zjištěné výsledky jsou v souladu i s jinými (sporadickými) studiemi, zaměřenými na efektivitu intervenčních opatření (Sathyanarayana et al. 2013, Barret et al. 2016), kdy se taktéž nepodařilo ověřit úspěšnost intervence a autoři dospěli k závěru, že výskyt ftalátů v prostředí je natolik rozšířený, že snížení expozice nelze dosáhnout pouze omezením jedné z expozičních cest. Intervence zaměřená na snížení expozice ftalátům se jeví jako problematická, neboť tato skupina látek je v prostředí značně rozšířena a strava zřejmě není rozhodujícím zdrojem expozice. U běžné populace se proto pouhou úpravou stravy nemusí podařit snížit expozici ftalátům. Navíc, je možné že koncentrace ftalátů v prostředí se vyznačují variabilitou závislou na teplotě, vzdušné vlhkosti a hustotě prachových částic. To zdůrazňuje význam preventivních opatření na regulační úrovni a poukazuje na nutnost směřovat výzkum na více expozičních cest. Prach, ovzduší z vnitřního prostředí budov, stavební materiály, plasty, textil a používání spotřebních výrobků (včetně kosmetických přípravků) byly uvedeny jako významné zdroje látek ze skupiny ftalátů (Wallner et al. 2016, Koch et al. 2013, Harley et al. 2016, Černá 2015). Značné rozšíření ftalátů v prostředí bylo již dostatečně prokázáno. Ftaláty jsou používány jako změkčovadla PVC a jiných plastů a jejich výskyt v prostředí je široký, např. v obalech, podlahových krytinách, hadicích, kabelech, stavebních materiálech (např. těsnicí tmely, adhezivní materiály, nátěry a materiály pro povrchovou úpravu), využívají se jako složky rozpouštědel, barev a čisticích prostředků, a jediný z ftalátů (diethyl ftalát - DEP) je povolenou přísadou kosmetických přípravků. Dalšími zdroji mohou být kontaminované suroviny pro výrobu potravin, hračky, oděvy (např. pláštěnky, nepromokavé oblečení) a další textilie (např. čalounění a plasty v autech). Ftaláty ale mohou být inhalovány i z ovzduší (při vyšších teplotách) a mohou být součástí prachu (Velázquez-Gómez et al. 2018). Vykazují nízkou akutní toxicitu, nejsou řazeny mezi látky karcinogenní nebo mutagenní. Většina z nich však je schopna interagovat s endokrinním systémem člověka (obvykle jako slabí antagonisté androgenního receptoru), jak se potvrdilo i v rámci této práce (viz bod 7.2.). Přestože potence ftalátů je udávána jako mnohem nižší než u endogenních hormonů nebo jiných xenobiotik (např. bisfenolů), vzhledem k jejich detekovaným vyšším koncentracím v moči běžné populace, a za předpokladu kontinuální expozice, jde o látky značného zdravotního významu. Jsou spojovány např. s poruchami reprodukce a hormonálního systému. Eliminace ftalátů probíhá v rámci hodin, proto námi zjištěné výkyvy v hodnotách v průběhu 4 dnů nejsou neočekávané. Metabolismus ftalátů je ovlivněn délkou postranního řetězce a probíhá dvoufázově. U ftalátů s kratším alkylovým řetězcem (např. dethyl ftalátu – DEP, dibutyl ftalátu – DBP) dochází v první fázi k hydrolýze na monoestery a v druhé fázi ke konjugaci s kyselinou glukuronovou a k vyloučení močí i stolicí. Ftaláty s delším uhlíkovým řetězcem (8 a více C) podléhají v druhé fázi oxidační reakci a tvoří sekundární metabolity. Primární i sekundární metabolity ftalátů jsou biologicky aktivní molekuly a mohou konjugovat s kyselinou glukuronovou. Glukuronidy i volné metabolity jsou vylučovány močí. Průkaz metabolitů v moči se používá k

odhadu expozice. Metabolity jsou detekovatelné i opakovaně v průběhu 24 hodin (Černá et al. 2015).

8.6. Informační materiál, vhodný pro edukaci odborné veřejnosti a preventivní poradenství ohledně potenciálního snižování expozice ED

Informační materiál, navržený ve dvou variantách (verze A3 – leták s názornou grafikou a přehledem preventivních přístupů (10 rad) a verze A4 – několikastránková informativní brožura s vysvětlením problematiky a s názornou grafikou) byl připraven s ohledem na mnohostrannou problematiku expozice ED u člověka a obsahuje preventivní doporučení, která mohou být aplikovatelná v běžném životě a mohou dle dosavadních vědecky podložených informací ve svém souhrnu přispět ke snižování expozice nejen ED, ale i ostatním kontaminujícím chemickým látkám. Organismus člověka je v reálných podmínkách vystaven směsi mnoha chemických látek, z nichž řada může fungovat jako potenciální ligandy receptorů s proměnlivou dobou účinnosti a afinitou a skrze receptorovou signalizaci interagovat s endokrinním systémem (Diamanti-Kandarakis et al. 2009; Sifakis et al., 2017). Fyziologické účinky mohou být ovlivněny mnoha různými faktory, jako je vývojové stadium, biologická dostupnost, distribuce, metabolická transformace, dispozice ve tkáních a stupeň eliminace (Bruning et al. 2016; Kato et al. 2006). Expozice člověka může být ovlivněna také individuálními fyziologickými, zdravotními, sociálními a ekologickými faktory, které ovlivňují jak přísun ED, tak jejich eliminaci (např. zdravotní stavléky, zdravotní poruchy, biorytmus, stárnutí, individuální variabilita metabolismu, genetické mutace a polymorfismy, výživa, životní prostředí, kouření, stres), které mohou modulovat počet receptorů, kinetiku, bioakumulaci (Galvez et al. 2018, Maney DL 2017, Engel & Wolff 2014, Hochberg et al. 2011, Darbre 2018, Gore et al. 2015, Kunická et al. 2014). Vzhledem k výše uvedeným biomechanismům a faktorům je obtížné přisoudit klinicky pozorované negativní účinky konkrétní chemické látky, protože asociace hladin ED s vybranými biomarkery účinku (např. hladiny hormonů, enzymů nebo proteinů) nemusí specificky potvrzovat kauzální vztah, neboť u člověka je expozice ED vždy multifaktoriální povahy (Vineis & Kriebel 2006). Poskytování preventivního poradenství má význam již v době plánování těhotenství a dále v průběhu citlivých fází vývoje (těhotenství, dětství, puberta), kdy je nutno co nejvíce zamezit zvýšené expozici potenciálně škodlivým látkám z prostředí (Kasper-Sonnenberg et al. 2017, van den Hazel et al. 2006). Vědecké informace naznačují, že životní styl včetně zaměstnání (Brophy et al. 2012, Brouwers et al. 2009, Hormann et al. 2014, Thayer et al. 2015), práce s chemickými látkami - např. rozpouštědly (Ekenga et al. 2015, Labrèche et al. 2010), životní prostředí, stravovací návyky či používání spotřebních výrobků mají vliv na expozici ED. Mezi preventivní přístupy pro snížení expozice ED jsou řazeny volba zaměstnání, denních aktivit, používání ochranných pomůcek, úpravy životního stylu, stravovacích návyků, vhodný výběr a úprava potravin, kojení, nekuřáctví. Věk, vysoký BMI a obezita mají taktéž vliv na výskyt ED v biologických tekutinách člověka (Pirard et al. 2018, Oktar et al. 2017). Koncentrace některých ED v moči může klesat např. po vyloučení potravin v konzervách a nápojů v plechovkách (Hartle et al. 2016, Rudel et al. 2011), zvýšené konzumaci rostlinné stravy (Ji et al. 2010), konzumací oloupaného ovoce nebo zeleniny (Yang et al. 2017), snížením konzumace obilovin, mouky, suchých plodů, ryb, tučných mléčných výrobků, tuků, oleje, konzervované zeleniny a masa (Mervish et al. 2014), nekuřáctvím (Pirard et al. 2018), omezením pobytu ve vnitřním prostředí

budov, eliminací prachu z prostředí a výběrem spotřebních výrobků (Oziol et al. 2018, Velázquez-Gómez et al. 2018, Koch et al. 2013, Harley et al. 2016). Preventivní přístupy mohou být účinnější a specifitější u látek, jejichž expozice nepochází z mnoha zdrojů. Intervence zaměřená na snížení expozice např. ftalátům může být problematická pro jejich značné rozšíření v prostředí (Sathyanarayana et al. 2013, Barret et al. 2016), proto lze předpokládat, že efektivního snížení expozice ftalátům je možno dosáhnout kombinací intervenčních opatření a více preventivních přístupů. Kromě dalších opatření (uvedených v informačním materiálu) lze zdůraznit tři praktická opatření snadno realizovatelná v běžném životě, která mohou přispět ke snížení expozice ftalátům: konzumace stravy z domácích surovin, méně časté používání kosmetických přípravků a produktů osobní péče a preferování jiných typů dopravy než automobilové (Martina et al. 2012).

9. Závěr

Primární cíl doktorského projektu, kterým bylo potvrzení nebo vyvrácení hypotézy č. 1, tj. že analogické sloučeniny ze stejné chemické skupiny, z nichž některé jsou využívány jako náhrady látek s endokrinní toxicitou, mohou mít podobné vlastnosti a interagovat s endokrinním systémem byl splněn. K ověření této hypotézy byly zavedeny *in vitro* metody pro identifikaci endokrinní disrupce chemických látek, které prokázaly v opakovaných experimentech vysokou robustnost, transferabilitu, sensitivitu, specificitu a využitelnost. Na základě těchto metod bylo potvrzeno, že analogické látky ze skupiny bisfenolů a ftalátů vykazují endokrinní aktivitu na estrogenové a androgenové receptory, a to různého typu (agonismus, antagonismus) a s různou potencí.

Další z cílů práce bylo potvrzení nebo vyvrácení hypotézy č. 2, tj. že extrakty spotřebních výrobků představují směs, která může vykazovat endokrinní potenciál. Tento cíl byl rovněž splněn, když využitelnost zavedených *in vitro* metod byla rozšířena i pro stanovení nebezpečných vlastností (endokrinní disrupce) spotřebních výrobků na bázi papíru, plastu, kosmetických přípravků a doplňků stravy.

Dalším cílem bylo potvrzení nebo vyvrácení hypotézy č. 3, tj. že látky s prokázanou endokrinní toxicitou, používané jako součást spotřebních výrobků, nebo jejich metabolity, mohou být detekovány v biologických tekutinách člověka a na základě jejich koncentrací lze stanovit prediktivní indikátory zvýšené expozice endokrinním disruptorům. Tento cíl byl taktéž splněn, když byly stanoveny koncentrace bisfenolů a metabolitů ftalátů a ověřeno, které z analytů jsou vhodné jako prediktivní indikátory zvýšené expozice.

Byl splněn i doplňkový cíl, zvolený s ohledem na vědecký vývoj v oblasti endokrinní disrupce, tj. ověření hypotézy č. 4, že endokrinní disruptory jsou eliminovány z organismu během několika hodin, nicméně člověk je vystaven jejich kontinuálnímu nepřetržitému přísunu, přičemž dietární expozice je hlavním faktorem ovlivňujícím celkovou expozici člověka endokrinním disruptorům. Bylo předpokládáno, že vhodnými stravovacími návyky, výběrem, přípravou stravy a jejím složením lze potenciálně snižovat expozici endokrinním disruptorům. Tato hypotéza však byla potvrzena pouze částečně, neboť v případě ftalátů se intervenční opatření (vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách) ukázalo jako nespecifické a nedostatečně účinné. Důvodem může být značné rozšíření i vyšší koncentrace ftalátů v prostředí a více expozičních cest. K potvrzení hypotézy však přispívá výsledek získaný v případě bisfenolů (zejména u bisfenolu A), kdy se četnost detekce negativních hodnot zvýšila po vyloučení konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách a detekované koncentrace BPA v moči byly nižší než při konzumaci min. dvou konzervovaných jídel a dvou nápojů v plechovkách za den.

Poslední z cílů doktorského projektu, který byl splněn, byla příprava návrhu informačního materiálu využitelného v klinické praxi, na jehož základě by mohly být informace o problematice endokrinních disruptorů předávány jak odborné, tak laické veřejnosti. Informační materiál, připravený na základě důkladné rešerše aktuálních odborných zdrojů, bude možno využít pro předávání aktuálních informací o problematice endokrinní disrupce odborné veřejnosti a může být využíván odborníky ve zdravotnictví při preventivním poradenství ohledně snižování expozice ED.

Přínosem doktorského projektu jsou nepochybně nově zavedené metody, které v budoucnu umožní detekci ED potenciálu spotřebních výrobků, čímž budou získána cenná data, vhodná např. pro edukaci odborné veřejnosti i plánování preventivních aktivit. Zároveň díky zavedeným metodám a zkušenostem s testováním chemických látek i spotřebních výrobků bude možné odborně podpořit intervenční přístup v ochraně veřejného zdraví či preventivní opatření zaměřená na ochranu spotřebitele. Preventivní opatření, preventivní poradenství nebo intervence mohou být odborně podpořeny díky dalším z výstupů doktorského projektu, kterým je návrh informačního materiálu o problematice endokrinních disruptorů.

Přestože není možné vztahovat výsledky dosažené v laboratorních podmínkách na reálnou situaci při expozici člověka – to je náplní přístupů při hodnocení rizika, využívání screeningových nástrojů *in silico* a metod *in vitro* je účinným přístupem pro sledování vlastností chemických látek i spotřebních výrobků v rámci primární prevence cílené na ochranu spotřebitele a poskytuje cenná data, se kterými je však nutno dále pracovat a využívat je i na regulační úrovni. Čím více budou nové pokročilé *in vitro* metody využívány, tím více bude dosaženo zpřesňování výsledků na základě znalosti historických dat. Pro ochranu veřejného zdraví a monitorování expozice běžné populace endokrinním disruptorům je vhodným přístupem v rámci prevence kombinace sledování chemických látek ve spotřebních výrobcích v rámci státního dozoru (chemické analýzy), detekce biologických účinků finálních spotřebních výrobků a biomonitorování prediktivních indikátorů expozice s využitím vhodných biologických vzorků, např. moči. Každý z přístupů poskytuje v rámci monitorování expozice člověka specifickou informaci. Endokrinní disrupce je natolik mnohovrstevnou problematikou, že propojení jednotlivých oborů, v rámci širokého oboru preventivní medicíny, jako je toxikologie, epidemiologie, chemie, biomedicína, nutně vyžaduje.

10. Seznam literárních zdrojů

- 1 Albert O, Desdoits-Lethimonier C, Lesné L, Legrand A, Guillé F, Bensalah K, Dejuçq-Rainsford N, Jégou B (2013). Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis *in vitro*. *Hum Reprod.* 2013 Jul;28(7):1890-8. doi: 10.1093/humrep/det112.
- 2 Allegretti M, Cesta MC, Locati M (2016). Allosteric Modulation of Chemoattractant Receptors. *Frontiers in Immunology* 7:170.
- 3 Almey A, Milner TA, Brake WG (2015). Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. *Horm Behav.* 2015 Aug;74:125-38. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.06.010.
- 4 Axerio-Cilies P, Lack NA, Nayana MR, Chan KH, Yeung A, Leblanc E, Guns ES, Rennie PS, Cherkasov A (2011). Inhibitors of androgen receptor activation function-2 (AF2) site identified through virtual screening. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 6197–6205.
- 5 Bae S, Hong YC (2015). Exposure to bisphenol A from drinking canned beverages increases blood pressure: randomized crossover trial. *Hypertension.* 2015 Feb;65(2):313-9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04261.
- 6 Balaguer P, Delfosse V, Grimaldi M, Bourguet W (2017). Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. *C R Biol.* 340(9-10):414-420.
- 7 Barrett ES, Velez M, Qiu X, Chen SR (2015). Reducing Prenatal Phthalate Exposure Through Maternal Dietary Changes: Results from a Pilot Study. *Matern Child Health J.* 2015;19(9):1936-42.
- 8 Bartoňková I, Dvořák Z (2018). Essential oils of culinary herbs and spices display agonist and antagonist activities at human aryl hydrocarbon receptor AhR. *Food Chem Toxicol.* 2018 Jan;111:374-384. doi: 10.1016/j.fct.2017.11.049.
- 9 Beilmann M, Boonen H, Czich A, Dear G, Hewitt P, Mow T, Newham P, Oinonen T, Pognan F, Roth A, Valentin JP, Van Goethem F, Weaver RJ, Birk B, Boyer S, Caloni F, Chen AE, Corvi R, Cronin MTD, Daneshian M, Ewart LC, Fitzgerald RE, Hamilton GA, Hartung T, Kangas JD, Kramer NI, Leist M, Marx U, Polak S, Rovida C, Testai E, Van der Water B, Vulto P, Steger-Hartmann T (2018). Optimizing drug discovery by Investigative Toxicology: Current and future trends. *ALTEX.* 2018 Dec 20. doi: 10.14573/altex.1808181. [Epub ahead of print]
- 10 Beken S, Kasper P, van der Laan JW (2016). Regulatory Acceptance of Alternative Methods in the Development and Approval of Pharmaceuticals. *Adv Exp Med Biol.* 2016;856:33-64.
- 11 Belej K, Kaplan O (2007). Hormonální regulace a možnosti jejího ovlivnění v léčbě karcinomu prostaty. *Klin Farmakol Farm* 2007; 21(3-4):114-118.
- 12 Bernal AJ, Jirtle RL (2010). Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 88: 938–944.
- 13 Bondesson M, Hao R, Lin CY, Williams C, Gustafsson JÅ (2014). Estrogen receptor signaling during vertebrate development. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Feb;1849(2):142-51. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.06.005.
- 14 Bonkhoff H (2018). Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression. *Prostate.* 2018 Jan;78(1):2-10. doi: 10.1002/pros.23446.
- 15 Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126(4):789-99.
- 16 Boucher JG, Ahmed S, Atlas E (2016). Bisphenol S induces adipogenesis in primary human preadipocytes from female donors. *Endocrinology.* 157: 1397–1407.

- 17 Brander SM, Gabler MK, Fowler NL, Connon RE, Schlenk D. Pyrethroid Pesticides as Endocrine Disruptors: Molecular Mechanisms in Vertebrates with a Focus on Fishes (2016). *Environ Sci Technol*. 2016 Sep 6;50(17):8977-92. doi: 10.1021/acs.est.6b02253. Epub 2016 Aug 19.
- 18 Brouwers MM, van Tongeren M, Hirst AA, Bretveld RW, Roeleveld N (2009). Occupational exposure to potential endocrine disruptors: further development of a job exposure matrix. *Occup Environ Med*. 2009 Sep;66(9):607-14. doi: 10.1136/oem.2008.042184.
- 19 Brophy JT, Keith MM, Watterson A, Park R, Gilbertson M, Maticka-Tyndale E, Beck M, Abu-Zahra H, Schneider K, Reinhartz A, DeMatteo R, Luginaah I (2012). Breast cancer risk in relation to occupations with exposure to carcinogens and endocrine disruptors: a Canadian case-control study. *Environ Health*. 2012; 11: 87. Published online 2012 Nov 19. doi: 10.1186/1476-069X-11-87
- 20 Bruning O, Rodenburg W, Wackers PF, van Oostrom C, Jonker MJ, Dekker RJ, Rauwerda H, Ensink WA, de Vries A, Breit TM (2016). Confounding Factors in the Transcriptome Analysis of an In-Vivo Exposure Experiment. *PLoS One* 11(1):e0145252.
- 21 Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):753-8.
- 22 Bultas J (2014). Působení léčiva na úrovni receptoru. *Remedia* 3:2014 Farmakologie pro klinika 24:3:2014, p. 189 - 193.
- 23 Buscariollo DL, Breuer GA, Wendler CC, Rivkees SA (2011). Caffeine acts via A1 adenosine receptors to disrupt embryonic cardiac function. *PLoS One*. 2011;6(12):e28296. doi: 10.1371/journal.pone.0028296. Epub 2011 Dec 2.
- 24 Cano-Nicolau J, Vaillant C, Pellegrini E, Charlier TD, Kah O, Coumailleau P (2016). Estrogenic Effects of Several BPA Analogs in the Developing Zebrafish Brain. *Front Neurosci*. 10: 112.
- 25 Cao XL, Perez-Locas C, Dufresne G, Clement G, Popovic S, Beraldin F, Dabeka RW, Feeley M (2011). Concentrations of bisphenol A in the composite food samples from the 2008 Canadian total diet study in Quebec City and dietary intake estimates. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2011 Jun;28(6):791-8. doi: 10.1080/19440049.2010.513015.
- 26 Casanova-Nakayama A, Wernicke von Siebenthal E, Kropf C, Oldenberg E, Segner H (2018). Immune-Specific Expression and Estrogenic Regulation of the Four Estrogen Receptor Isoforms in Female Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 21;19(4).
- 27 Ceruti JM, Leirós GJ, Balañá ME (2018). Androgens and androgen receptor action in skin and hair follicles. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 Apr 15;465:122-133. doi: 10.1016/j.mce.2017.09.009.
- 28 Coleman KP, Toscano WA, Wiese TE (2003). QSAR models of the *in vitro* estrogen activity of bisphenol A analogs. *QSAR Comb Sci*. 22(1): 78–88.
- 29 Černá M, Malý M, Rudnai P, Középesy S, Náray M, Halzlová K, Jajcaj M, Grafnetterová A, Krsková A, Antošová D, Forysová K, Den Hond E, Schoeters G, Joas R, Casteleyn L, Joas A, Biot P, Aerts D, Angerer J, Bloemen L, Castaño A, Esteban M, Koch HM, Kolossa-Gehring M, Gutleb AC, Pavloušková J, Vrbík K (2015). Case study: Possible differences in phthalates exposure among the Czech, Hungarian, and Slovak populations identified based on the DEMOCOPHES pilot study results. *Environ Res*. 2015 Aug;141:118-24. doi: 10.1016/j.envres.2014.10.025. Epub 2014 Dec 19.
- 30 Dahl G, Akerud T. (2013). Pharmacokinetics and the drug-target residence time concept. *Drug Discov*. 18(15–16): 697–707.
- 31 Da-Hye K, Chang Gyun P, Sang Hun K, Young Jun K (2019). The Effects of Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate (MEHP) on Human Estrogen Receptor (hER) and Androgen Receptor (hAR) by YES/YAS *In vitro* Assay. *Molecules*. 2019 Apr; 24(8): 1558. Published online 2019 Apr 19. doi: 10.3390/molecules24081558

- 32 De Amicis F, Chimento A, Montalto FI, Casaburi I, Sirianni R, Pezzi V (2019). Steroid Receptor Signallings as Targets for Resveratrol Actions in Breast and Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 3;20(5). pii: E1087. doi: 10.3390/ijms20051087.
- 33 Den Hond E, Tournaye H, De Sutter P, Ombet W, Baeyens W, Covaci A, Cox B, Nawrot TS, Van Larebeke N, D'Hooghe T (2015). Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environ Int.* 84: 154–160.
- 34 Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser r, Prins gs, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement *Endocr Rev.* 2009 Jun; 30(4): 293–342. doi: 10.1210/er.2009-0002
- 35 Dodson RE, Nishioka M, Standley LJ, Perovich LJ, Brody JG, Rudel RA (2012). Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. *Environ Health Perspect.* 120(7):935–43.
- 36 Dvořáková M, Kejlová K, Bendová H, Rucki M, Kohout P, Vavrouš A, Jírová D (2016). Alternative methods *in vitro* for screening of endocrine disruptors. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016 Dec 18;37(Suppl1):123-131.
- 37 Dvořáková M, Kejlová K, Rucki M, Jírová D (2018). Selected bisphenols and phthalates screened for estrogen and androgen disruption by *in silico* and *in vitro* methods. *Neuro Endocrinol Lett.* 2018 Dec;39(5):409-416.
- 38 EC (2018a). Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018 amending Annex II to Regulation (EC) No 1107/2009 by setting out scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties. *Official Journal of the European Union*, L 101, Pages 33-36, Brussels, 2018.
- 39 EC (2018b). Corrigendum to Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018 amending Annex II to Regulation (EC) No 1107/2009 by setting out scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties. *Official Journal of the European Union*, L 111/10, Page 10, Brussels, 2018.
- 40 Ekenga CC, Parks CG, D'Aloisio AA, DeRoo LA, Sandler DP (2015). Breast cancer risk after occupational solvent exposure: the influence of timing and setting. *Cancer Res.* Author manuscript; available in PMC 2015 Jun 1. Published in final edited form as: *Cancer Res.* 2014 Jun 1; 74(11): 3076–3083. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2430
- 41 ECHA (2015). European Chemicals Agency (2015). Roadmap for SVHC Identification and Implementation of REACH Risk Management Measures. Annual Report. 23 March 2015; ECHA-15-R-04-EN; Catalogue number: ED-AP-15-001-EN-N, ISBN: 978-92-9247-292-4.
- 42 Eladak S, Grisin T, Moison D, Guerquin MJ, N'Tumba-Byn T, PozziGaudin S, et al. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil Steril.* 103(1): 0015–0282.
- 43 Engel SM, Wolff MS (2014). Causal Inference Considerations for Endocrine Disruptor Research in Children's Health. *Annu Rev Public Health.* Author manuscript; available in PMC 2014 Jun 2. Published in final edited form as: *Annu Rev Public Health.* 2013; 34: 139–158. doi: 10.1146/annurev-publhealth-031811-124556
- 44 EU (2009). Regulation (EC) No 1223/2009 Of The European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Official Journal of the European Union* L342:59-209.
- 45 EU (2010) Directive 2010/63/EU Of The European Parliament and of the Council of 22 September 2010 On the Protection of Animals used for Scientific Purposes. *Official Journal of European Union* L276: 33–79.
- 46 ECHA, EFSA, JRC (2018). European Chemicals Agency (ECHA) and European Food Safety Authority (EFSA) and the Joint Research Centre (JRC) (2018). Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009 (Pre-publication version; June 2018), Question number: EFSA-Q-2016-00825 (Output number ON-5311).

- 47 Ezechiáš M, Cajthaml T (2018). Receptor partial agonism and method to express receptor partial activation with respect to novel Full Logistic Model of mixture toxicology. *Toxicology*. 2018 Jan 15;393:26-33. doi: 10.1016/j.tox.2017.10.012.
- 48 Farman N, Rafestin-Oblin ME (2001). Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 280(2):F181-92. 12.
- 49 Festuccia N, Owens N, Navarro P (2018). Esrrb, an estrogen-related receptor involved in early development, pluripotency, and reprogramming. *FEBS Lett*. 2018 Mar;592(6):852-877. doi: 10.1002/1873-3468.12826.
- 50 Fietz D, Ratzenböck C, Hartmann K, Raabe O, Kliesch S, Weidner W, Klug J, Bergmann M. Expression pattern of estrogen receptors α and β and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis. *Histochem Cell Biol*. 2014 Oct;142(4):421-32. doi: 10.1007/s00418-014-1216-z.
- 51 Folmer RHA (2018). Drug target residence time: a misleading concept. *Drug Discovery Today* 23(1):12-16
- 52 Fontana J, Trnka J, Maďa P, Ivák P, Lavříková P, Nováková L, Pavelka M, Šajdíková M, Šmída J, Blanková B, Vojtěch P, Balínová P, Dyba J, Kroupa J, Mezera V, Kyselica M, Polách J, Pavlínková A, Dusíková K (2015). Funkce buněk a lidského těla. Multimediální skriptum. Projekt FRVŠ 637/2013 a 236078/IPUK/2015. (Dostupné online: <http://fbt.cz/skriptum/>, 21. 1. 2019):
- 53 Friedecký B (2009). Bias, nejistota, celková chyba. *Klin. Biochem. Metab.*, 17 (38), 2009, No. 2, p. 106–108.
- 54 Fromme H, Bolte G, Koch HM, Angerer J, Boehmer S, Drexler H, Mayer R, Liebl B. (2007). Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210: 21–33.
- 55 Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calza L, Dessi-Fulgheri F, Fernandez M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC (2012). Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems, *J. Neuroendocrinol.* 24 (2012) 144–159.
- 56 Fujita R, Liu J, Shimizu K, Konishi F, Noda K, Kumamoto S, Ueda C, Tajiri H, Kaneko S, Suimi Y, Kondo R (2005). Anti-androgenic activities of *Ganoderma lucidum*. *J Ethnopharmacol.* 2005 Oct 31;102(1):107-12.
- 57 Galvez MP, McGovern K, Teitelbaum SL, Windham G, Wolff MS (2018). Neighborhood Factors and Urinary Metabolites of Nicotine, Phthalates, and Dichlorobenzene. *Pediatrics*. 2018 Jan;141(Suppl 1):S87-S95. doi: 10.1542/peds.2017-1026L.
- 58 Gangkak G, Bhattar R, Mittal A, Yadav SS, Tomar V, Yadav A, Mehta J (2017). Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in prostate and clinical correlation in men with benign prostatic hyperplasia. *Investig Clin Urol*. 2017 Mar;58(2):117-126. doi: 10.4111/icu.2017.58.2.117.
- 59 Geens T, Goeyens L, Covaci A (2011). Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked ? *Int J Hyg Environ Health*. 2011 Sep;214(5):339-47. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.04.005. Epub 2011 May 12.
- 60 Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Maghuin-Rogister G, Pironnet AM, Pussemier L, Scippo ML, Van Loco J, Covaci A (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol*. 2012 Oct;50(10):3725-40. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.059. Epub 2012 Aug 4.
- 61 Gérard C, Brown KA (2018). Obesity and breast cancer - Role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 May 5;466:15-30. doi: 10.1016/j.mce.2017.09.014.
- 62 Goldinger DM, Demierre AL, Zoller O, Rupp H, Reinhard H, Magnin R (2015). Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland. *Regul Toxicol Pharmacol*. 71(3): 453–62.

- 63 Goldstone AE, Chen Z, Perry MJ, Kannan K, Louis GM (2015). Urinary bisphenol A and semen quality, the LIFE Study. *Reprod Toxicol.* 51: 7–13.
- 64 Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J, Zoeller RT (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev.* 2015 Dec; 36(6): E1–E150. Published online 2015 Nov 6. doi: 10.1210/er.2015-1010
- 65 Goto S, Okuno Y, Hattori M, Nishioka T, Kanehisa M (2002). LIGAND: database of chemical compounds and reactions in biological pathways. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(1):402-4.
- 66 Greally JM, Jacobs MN (2013). *In vitro* and *In vivo* Testing Methods of Epigenomic Endpoints for Evaluating Endocrine Disruptors. *ALTEX.* 30(4): 445–71.
- 67 Grotenhermen F. Pharmacology of cannabinoids (2004). *Neuro Endocrinol Lett.* 2004 Feb-Apr;25(1-2):14-23.
- 68 Hampl R, Kubátová J, Heráček J, Sobotka V, Stárka L (2013). Hormones and endocrine disruptors in human seminal plasma. *Endocr Regul.* 47: 149–158.
- 69 Harley KG, Kogut K, Madrigal DS, et al. (2016). Reducing Phthalate, Paraben, and Phenol Exposure from Personal Care Products in Adolescent Girls: Findings from the HERMOSA Intervention Study. *Environ Health Perspect.* 2016;124(10):1600-1607.
- 70 Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP (1997). The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ Health Perspect.* 1997 Aug; 105(8): 802–811. doi: 10.1289/ehp.97105802
- 71 Hartle JC, Navas-Acien A, Lawrence RS (2016). The consumption of canned food and beverages and urinary Bisphenol A concentrations in NHANES 2003-2008. *Environ Res.* 2016 Oct;150:375-382. doi: 10.1016/j.envres.2016.06.008.
- 72 Hayashi M, Futawaka K, Matsushita M, Hatai M, Yoshikawa N, Nakamura K, Tagami T, Moriyama K (2018). Cigarette Smoke Extract Disrupts Transcriptional Activities Mediated by Thyroid Hormones and Its Receptors. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(3):383-393. doi: 10.1248/bpb.b17-00735.
- 73 Hecker M, Hollert H (2011). Endocrine disruptor screening: Regulatory perspectives and needs. *Environ. Sci. Europe.* 23: 1–14.
- 74 Heráček J, Urban M, Záleský M, Sobotka V, Kosařová M, Zudová M, Halouzková Š, Brachtlová T, Stárka L.(2005). Gen pro androgenní receptor a mužská neplodnost. *Zdraví a medicína. Genetika* (Dostupné online 12. 3. 2019: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/gen-pro-androgenni-receptor-a-muzska-neplodnost-169655>)
- 75 Hernández AF, Gil F, Lacasaña M (2017). Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Arch Toxicol.* 2017 Oct;91(10):3211-3223. doi: 10.1007/s00204-017-2043-5.
- 76 Hlaváč V, Brynychová V, Václavíková R, Ehrlichová M, Vrána D, Pecha V, Trnková M, Kodet R, Mrhalová M, Kubáčková K, Gatěk J, Vážan P, Souček P (2014). The role of cytochromes p450 and aldo-keto reductases in prognosis of breast carcinoma patients. *Medicine (Baltimore).* 2014 Dec;93(28):e255. doi: 10.1097/MD.0000000000000255.
- 77 Hoffmann M, Gebauer S, Nüchter M, Baber R, Ried J, von Bergen M, Kiess W (2017). Endocrine disruptors : Evidence from epidemiological studies necessitates a critical review of model systems. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2017 Jun;60(6):640-648. doi: 10.1007/s00103-017-2551-8. [Article in German]
- 78 Hochberg Z, Feil R, Constancia M, Fraga M, Junien C, Carel JC, Boileau P, Le Bouc Y, Deal CL, Lillycrop K, Scharfmann R, Sheppard A, Skinner M, Szyf M, Waterland RA, Waxman DJ, Whitelaw E, Ong K, Albertsson-Wikland K (2011). Child Health, Developmental Plasticity, and Epigenetic Programming. *Endocr Rev.* 2011 Apr; 32(2): 159–224. Published online 2010 Oct 22. doi: 10.1210/er.2009-0039
- 79 Hormann AM, Vom Saal FS, Nagel SC, Stahlhut RW, Moyer CL, Ellersieck MR, (2014). Holding thermal receipt paper and eating food after using hand sanitizer results in high serum bioactive and urine total levels of bisphenol A (BPA). *PLoS One.* 9(10):e110509

- 80 Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng YL, Wu Y, et al. (2016). Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environ. Sci. Technol.* 50(11): 5438–5453.
- 81 Chen FP, Chien MH (2014). Lower concentrations of phthalates induce proliferation in human breast cancer cells. *Climacteric*, 17 (2014), pp. 377-384
- 82 Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Nomoto S, Horiguchi H, Kato S, Kayama F (2002). Terpenoids found in the umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER(alpha) and ERbeta: differential transcription activity between ferutinine-liganded ER(alpha) and ERbeta. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Feb 22;291(2):354-60.
- 83 ISO (2018). ISO 19040-1:2018. Water quality – Determination of the estrogenic potential of water and waste water – Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*): ISO 19040-1:2018 (E). 2018/8: Geneva, Switzerland 2018/8, p.
- 84 Jennings P (2015). The future of *in vitro* toxicology. *Toxicol In vitro* . 2015 Sep;29(6):1217-21. doi: 10.1016/j.tiv.2014.08.011.
- 85 Ji K, Hong S, Kho Y, Choi K (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environ Sci Technol.* 47: 8793–8800.
- 86 Ji K, Lim Kho Y, Park Y, Choi K (2010). Influence of a five-day vegetarian diet on urinary levels of antibiotics and phthalate metabolites: a pilot study with "Temple Stay" participants. *Environ Res.* 2010 May;110(4):375-82. doi: 10.1016/j.envres.2010.02.008.
- 87 Jiménez-Díaz I, Molina-Molina JM, Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Navalón A, Real M, Sáenz JM, Fernández MF, Olea N (2013). Simultaneous determination of the UV-filters benzyl salicylate, phenyl salicylate, octyl salicylate, homosalate, 3-(4-methylbenzylidene) camphor and 3-benzylidene camphor in human placental tissue by LC-MS/MS. Assessment of their *in vitro* endocrine activity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013 Oct 1;936:80-7. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.08.006. Epub 2013 Aug 8.
- 88 Kampa M, Notas G, Castanas E (2017). Natural extranuclear androgen receptor ligands as endocrine disruptors of cancer cell growth. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Dec 5;457:43-48. doi: 10.1016/j.mce.2017.02.021. Epub 2017 Feb 16.
- 89 Kappenstein OI, Vieth B, Luch A, Pfaff K (2012). Toxicologically relevant phthalates in food. *Exp Suppl.* 2012;101:87-106. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_4.
- 90 Kasper-Sonnenberg M, Wittsiepe J, Wald K, Koch HM, Wilhelm M (2017). Pre-pubertal exposure with phthalates and bisphenol A and pubertal development. *PLoS One.* 2017 Nov 20;12(11):e0187922. doi: 10.1371/journal.pone.0187922.
- 91 Kato I, Ren J, Heilbrun LK, Djuric Z (2006). Intra- and inter-individual variability in measurements of biomarkers for oxidative damage *in vivo*: Nutrition and Breast Health Study. *Biomarkers* 11(2):143-52.
- 92 Kejlová K, Dvořáková M, Vavrouš A, Ševčík V, Kandárová H, Letašiová S, Sosnovcová J, Jírová D (2019). Toxicity of food contact paper evaluated by combined biological and chemical methods. *Toxicol In vitro* . 2019 Apr 2;59:26-34. doi: 10.1016/j.tiv.2019.04.001.
- 93 Kenakin T. (2017). Signaling bias in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2017 Apr;12(4):321-333. doi: 10.1080/17460441.2017.1297417.
- 94 Kim KH, Young BD, Bender JR (2014). Endothelial estrogen receptor isoforms and cardiovascular disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 May 25;389(1-2):65-70. doi: 10.1016/j.mce.2014.02.001.
- 95 Kittnar O. a kol. (2011). *Lékařská fyziologie*. 1. vydání. Praha : Grada, 2011. 790 s. ISBN 978-80-247-3068-4
- 95 Klopčic I, Dolenc MS (2017). Endocrine Activity of AVB, 2MR, BHA, and Their Mixtures. *Toxicol Sci.* 2017 Mar 1;156(1):240-251. doi: 10.1093/toxsci/kfw253.

- 96 Koch HM, Lorber M, Christensen KL, Palmke C, Koslitz S, Bruning T (2013). Identifying sources of phthalate exposure with human biomonitoring: Results of a 48h fasting study with urine collection and personal activity patterns. *Int J Hyg Environ Health* 2013; 216: 672–681.
- 97 Kortenkamp A, Backhaus T, Faust M (2009). State of the Art Report on Mixture Toxicity. Final Report. Executive Summary. Dostupné online: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report_mixture_toxicity.pdf. [cit. 11/12/2018]
- 98 Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863–870.
- 99 Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*. 1998;139(10):4252–4263.
- 100 Kundakovic M, Gudsnuk K, Franks B, Madrid J, Miller RL, Perera FP, et al. (2013) Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(24): 9956–61.
- 101 Kunická T, Václavíková R, Hlaváč V, Vrána D, Pecha V, Rauš K, Trnková M, Kubáčková K, Ambruš M, Vodičková L, Vodička P, Souček P (2014). Non-coding polymorphisms in nucleotide binding domain 1 in ABCC1 gene associate with transcript level and survival of patients with breast cancer. *PLoS One*. 2014 Jul 31;9(7):e101740. doi: 10.1371/journal.pone.0101740. eCollection 2014.
- 102 Labrèche F, Goldberg MS, Valois MF, Nadon L. Postmenopausal breast cancer and occupational exposures (2010). *Occup Environ Med*. 2010 Apr;67(4):263-9. doi: 10.1136/oem.2009.049817.
- 103 Lakind JS, Naiman DQ (2011). Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2011 May-Jun;21(3): 272-9. doi: 10.1038/jes.2010.9.
- 104 Laudet V, Gronemeyer, (2002). Introduction to the nuclear receptors. In *The Nuclear Receptor FactsBook*; Academic Press: London, UK, 2002.
- 105 Le Fol V, Aït-Aïssa S, Sonavane M, Porcher JM, Balaguer P, Cravedi JP, Zalko D, Brion F (2017). *In vitro* and *in vivo* estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017 Aug;142:150-156. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.04.009
- 106 Le HT, Schaldach CM, Firestone GL, Bjeldanes LF (2003). Plant-derived 3,3'-Diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells *J. Biol. Chem.*, 278 (2003), pp. 21136-21145.
- 107 Leung JK, & Sadar, MD (2017). Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Frontiers in endocrinology*, 8, 2. doi:10.3389/fendo.2017.00002
- 108 Liao C, Liu F, Kannan K (2012). Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environ Sci Technol*. 46: 6515–6522.25
- 109 Liao C, Kannan K (2013). Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *J Agric Food Chem*. 61: 4655–4662.26
- 110 Liao C, Kannan K (2014). A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States. *Arch Environ Contam Toxicol*. 67: 50–59.
- 111 Liebsch M, Grune B, Seiler A, Butzke D, Oelgeschläger M, Pirow R, Adler S, Riebeling C, Luch A (2011). Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Arch Toxicol*. 2011 Aug;85(8):841-58. doi: 10.1007/s00204-011-0718-x

- 112 Lorenzetti S, Marcoccia D, Mantovani A (2015). Biomarkers of effect in endocrine disruption: how to link a functional assay to an adverse outcome pathway. *Ann Ist Super Sanita.* 2015;51(2):167-71. doi: 10.4415/ANN_15_02_16.
- 113 Luccio-Camelo DC, Prins GS (2011). Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127: 74–82.
- 114 Lynch C, Zhao J, Huang R, Kanaya N, Bernal L, Hsieh JH, Auerbach SS, Witt KL, Merrick BA, Chen S, Teng CT, Xia M (2018). Identification of Estrogen-Related Receptor α Agonists in the Tox21 Compound Library. *Endocrinology.* 2018 Feb 1;159(2):744-753. doi: 10.1210/en.2017-00658.
- Maney DL (2017). Polymorphisms in sex steroid receptors: From gene sequence to behavior *Front Neuroendocrinol.* 2017 Oct; 47: 47–65. Published online 2017 Jul 10. doi: 10.1016/j.yfrne.2017.07.003
- 115 Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M (2013). The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nature Reviews. Endocrinology.* 9(12): 699–712.
- 116 Marczell I, Balogh P, Nyiro G, Kiss AL, Kovacs B, Bekesi G, Racz K, Patocs A (2018). Membrane-bound estrogen receptor alpha initiated signaling is dynamin dependent in breast cancer cells. *European Journal of Medical Research* 2018 23:31. <https://doi.org/10.1186/s40001-018-0328-7>
- 117 Marie C, Lémercy D, Vendittelli F, Sauvart-Rochat MP (2019). Phthalate Exposure in Pregnant Women: Risk Perception and Preventive Advice of Perinatal Health Professionals. *Matern Child Health J.* 2019 Mar;23(3):335-345. doi: 10.1007/s10995-018-2668-x.
- 118 Martina CA, Weiss B, Swan SH (2012). Lifestyle behaviors associated with exposures to endocrine disruptors. *Neurotoxicology.* 2012 Dec;33(6):1427-33. doi: 10.1016/j.neuro.2012.05.016. Epub 2012 Jun 26.
- 119 Marty MS, Carney EW, Rowlands JC (2011). Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci* 120:S93–S108.
- 120 Matějů M, Stříbrná J, Zikán M, Kleibl Z, Janatová M, Kormunda S, Novotný J, Souček P, Petruželka L, Pohlreich P (2010). Population-based study of BRCA1/2 mutations: family history based criteria identify minority of mutation carriers. *Neoplasma.* 2010;57(3):280-5.
- 121 Meeker JD (2012). Exposure to Environmental Endocrine Disruptors and Child Development. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 166(10): 952–958.
- 122 Meeker JD, Calafat AM, Hauser R (2009). Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. *J Androl* 2009; 30: 287–297.
- 123 Melmed S (2016). *Williams Textbook of Endocrinology.* Elsevier Health Sciences. pp. 621, 711. ISBN 978-0-323-29738-7.
- 124 Mervish N, McGovern KJ, Teitelbaum SL, Pinney SM, Windham GC, Biro FM, Kushi LH, Silva MJ, Ye X, Calafat AM, Wolff MS (2014). Dietary predictors of urinary environmental biomarkers in young girls. *BCERP, 2004-7. Environ Res.* 2014 Aug;133:12-9. doi: 10.1016/j.envres.2014.04.040.
- 125 Molina L, Figueroa CD, Bhoola KD, Ehrenfeld P (2017). GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2017 Aug;21(8):755-766. doi: 10.1080/14728222.2017.1350264. Epub 2017 Jul 12.
- 126 Molina-Molina JM, Jiménez-Díaz I, Fernández MF, Rodríguez-Carrillo A, Peinado FM, Mustieles V, Barouki R, Piccoli C, Olea N, Freire C (2019). Determination of bisphenol A and bisphenol S concentrations and assessment of estrogen- and anti-androgen-like activities in thermal paper receipts from Brazil, France, and Spain. *Environ Res.* 2019 Mar;170:406-415. doi: 10.1016/j.envres.2018.12.046. Epub 2018 Dec 21.
- 127 Molina-Molina JM, Amaya E, Grimaldi M, Sáenz JM, Real M, Fernández MF, Balaguer P, Olea N (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other

- bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Oct 1;272(1):127-36. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.015. Epub 2013 May 25.
- 128 Monaghan, AmyE; McEwan, IainJ (2016). A sting in the tail: the N-terminal domain of the androgen receptor as a drug target. *Asian Journal of Andrology.* 0 (0): 0. doi:10.4103/1008-682X.181081.
- 129 Mráz M, Svačina Š, Kotrlíková E, Piecha R, Vrbík K, Pavloušková J, et al. (2016). Potential sources of phthalates and bisphenol A and their significance in the development of metabolic diseases.[Article in Czech]. *Cas Lek Cesk.* 155(3): 11–5
- 130 Müllerová D, Kopecký J (2007). White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* 56: 375–381.
- 131 Němcová-Fürstová V, Kopperová D, Balušíková K, Ehrlichová M, Brynychová V, Václavíková R, Daniel P, Souček P, Kovář J (2016). Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016 Nov 1;310:215-228. doi: 10.1016/j.taap.2016.09.020. Epub 2016 Sep 21.
- 132 Nikolakis G, Stratakis CA, Kanaki T, Slominski A, Zouboulis CC (2016). Skin steroidogenesis in health and disease. *Rev Endocr Metab Disord.* 2016 Sep;17(3):247-258.
- 133 Notman R, den Otter WK, Noro MG, Briels WJ, Anwar J (2007). The Permeability Enhancing Mechanism of DMSO in Ceramide Bilayers Simulated by Molecular Dynamics. *Biophys J.* 2007 Sep 15; 93(6): 2056–2068. Published online 2007 May 18. doi: 10.1529/biophysj.107.104703
- 134 OECD (2007). Guidance Document on the Validation of (Q)SAR Models. OECD Series on Testing and Assessment, No. 69 (2007), OECD Publishing, Paris.
- 135 OECD (2017). Application manual of OECD QSAR Toolbox v.4. (Dostupné online 19.5.2019: https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/TB4_Application_manual_F1.compressed.pdf)
- 136 OECD (2018). Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, No. 150, OECD Publishing, Paris, doi: <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.
- 137 Oktar S, Sungur S, Okur R, Yilmaz N, Ustun I, Gokce C (2015). The relationship between phthalates and obesity: serum and urine concentrations of phthalates. *Minerva Endocrinol.* 2017 Mar;42(1):46-52. doi: 10.23736/S0391-1977.16.02295-1.
- 138 Orton F, Ermler S, Kugathas S, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A (2014). Mixture effects at very low doses with combinations of anti-androgenic pesticides, antioxidants, industrial pollutant and chemicals used in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol.* 278(3): 201–8.
- 139 Orton F, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A (2011). Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as *in vitro* antiandrogens. *Environ Health Perspect.* 2011 Jun;119(6):794-800. doi: 10.1289/ehp.1002895.
- 140 Ozáez I, Aquilino M, Morcillo G, Martínez-Guitarte JL (2016). UV filters induce transcriptional changes of different hormonal receptors in *Chironomus riparius* embryos and larvae. *Environ Pollut.* 2016 Jul;214:239-247. doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.023.
- 141 Oziol L, Alliot F, Botton J, Bimbot M, Huteau V, Levi Y, Chevreuil M (2018). First characterization of the endocrine-disrupting potential of indoor gaseous and particulate contamination: comparison with urban outdoor air (France). *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017 Jan;24(3):3142-3152. doi: 10.1007/s11356-016-8045-7. Epub 2016 Nov 18.
- 142 Pang X, Fu W, Wang J, Kang, Xu L, Zhao Y, Liu AL, Du GH (2018). Identification of Estrogen Receptor α Antagonists from Natural Products via *In vitro* and *In silico* Approaches. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 May 10;2018:6040149. doi: 10.1155/2018/6040149
- 143 Pascal LE, Wang Z (2014). Unzipping androgen action through ZIP9: a novel membrane androgen receptor. *Endocrinology.* 2014 Nov;155(11):4120-3. doi: 10.1210/en.2014-1749.

- 144 Paris F, Balaguer P, Terouanne B, Servant N, Lacoste C, Cravedi JP, Nicolas JC, Sultan C (2002). Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 193: 43–49.
- 145 Park SE, Lim SR, Choi HK, Bae J (2016). Triazine herbicides inhibit relaxin signaling and disrupt nitric oxide homeostasis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016 Sep 15;307:10-18. doi: 10.1016/j.taap.2016.07.010. Epub 2016 Jul 16.
- 146 Patisaul HB (2017). Endocrine disruption by dietary phyto-oestrogens: impact on dimorphic sexual systems and behaviours. *Proc Nutr Soc.* 2017;76(2):130-144.
- 147 Pereira, J., Selbourne, M.D.C., Poças, F (2019). Determination of phthalates in olive oil from European market. *Food Control*, Volume 98, Issue undefined, April 2019
- 148 Piecha R, Svačina Š, Malý M, Vrbík K, Lacinová Z, Haluzík M, Pavloušková J, Vavrouš A, Matějková D, Müllerová D, Mráz M, Matoulek M (2016). Urine Levels of Phthalate Metabolites and Bisphenol A in Relation to Main Metabolic Syndrome Components: Dyslipidemia, Hypertension and Type 2 Diabetes. A Pilot Study. *Cent Eur J Public Health.* 2016 Dec;24(4):297-301. doi: 10.21101/cejph.a4704.
- 149 Pinkas J, Gujski M, Wierzbińska-Stępnia A, Owoc A, Bojar I (2016). The polymorphism of estrogen receptor α is important for metabolic consequences associated with menopause. *Endokrynol Pol.* 2016;67(6):608-614. doi:
- 150 Pirard C, Compere S, Firquet K, Charlier C (2018).The current environmental levels of endocrine disruptors (mercury, cadmium, organochlorine pesticides and PCBs) in a Belgian adult population and their predictors of exposure. *Int J Hyg Environ Health.* 2018 Mar;221(2):211-222. doi: 10.1016/j.ijheh.2017.10.010. Epub 2017 Oct 31.
- 151 Pop A, Drugan T, Gutleb AC, Lupu D, Cherfan J, Loghin F, Kiss B (2016). Individual and combined *in vitro* (anti)androgenic effects of certain food additives and cosmetic preservatives. *Toxicol In vitro.* 2016 Apr;32:269-77. doi: 10.1016/j.tiv.2016.01.012. Epub 2016 Jan 23.
- 152 Prabhushankar R, Krueger C, Manrique C (2014). Membrane estrogen receptors: their role in blood pressure regulation and cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep.* 2014 Jan;16(1):408. doi: 10.1007/s11906-013-0408-6.
- 153 Prasanth GK, Divya LM, Sadasivan C (2010). Bisphenol-A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an *in silico* study. *J. Appl. Toxicol.* 30: 769–774.
- 154 Prusinski L, Al-Hendy A, Yang Q (2016). Developmental exposure to endocrine disrupting chemicals alters the epigenome: Identification of reprogrammed targets.*Gynecol Obstet Res.* 2016 Jul;3(1):1-6.
- 155 Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A (2002). Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone activity. *Environ Health Perspect.* 110(9): 917–921.
- 156 Rana BK, Bourne PE, Insel PA (2012). Receptor databases and computational websites for ligand binding. *Methods Mol Biol.* 2012;897:1-13. doi: 10.1007/978-1-61779-909-9_1.
- 157 Rancière F, Lyons JG, Loh VHY, Botton J, Galloway T, Wang T, et al. (2015). Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence. *Environ Health.* 14: 46.
- 158 Raudrant D, Rabe T (2003). "Progestogens with antiandrogenic properties". *Drugs.* 63 (5): 463–92. doi:10.2165/00003495-200363050-00003.
- 159 Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 307 (5715): 1625–30.
- 160 Rider CV, Furr JR, Wilson VS, Gray LE Jr (2010). Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. *Int J Androl.* 33(2): 443–62.

- 161 Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walser-Kuntz DR, vom Saal FS (2007). *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol.* 24: 199–224.
- 162 Richter P, Faroon O, Pappas RS (2017). Cadmium and Cadmium/Zinc Ratios and Tobacco-Related Morbidities. *Int J Environ Res Public Health.* 2017 Sep 29;14(10). pii: E1154. doi: 10.3390/ijerph14101154.
- 163 Roelofs MJE, van den Berg M, Bovee TFH, Piersma AH, Van Duursen MBM (2015). Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. *Toxicology.* 329: 10–20.
- 164 Rodgers, K.M.; Udesky, J.O.; Rudel, R.A.; Brody, J.G (2018). Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environ. Res.* 2018, 160, 152–182.
- 165 Rogers JM, Denison MS (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and antiestrogenic chemicals. *In Vitro Mol Toxicol.* 13(1): 67–82.
- 166 Rochester JR, Bolden AL (2015). Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect.* 123(7): 643–650.
- 167 Rokyta R. a kol. (2015). *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi.* Praha: Grada Publishing a.s., 2015. ISBN 8024799022, 9788024799025. Počet stran: 712
- 168 Routledge, EJ., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, GC., Waldock, M., and Sumpter, JP (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environmental Science & Technology,* 32, 1559–1565.
- 169 Routledge EJ, Sumpter JP (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.,* 15 (1996), pp. 241-248
- 170 Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127(2011): 27–34.
- 171 Rudel RA, Gray JM, Engel CL, Rawsthorne TW, Dodson RE, Ackerman JM, Rizzo J, Nudelman JL, Brody JG (2011). Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: findings from a dietary intervention. *Environ Health Perspect.* 2011 Jul;119(7):914-20. doi: 10.1289/ehp.1003170.
- 172 Saczko J, Michel O, Chwiłkowska A, Sawicka E, Mączyńska J, Kulbacka J (2017). Estrogen Receptors in Cell Membranes: Regulation and Signaling. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2017;227:93-105. doi: 10.1007/978-3-319-56895-9_6.
- 173 Salahudeen MS, Nishtala PS (2017). An overview of pharmacodynamic modelling, ligand-binding approach and its application in clinical practice. *Saudi Pharm J.* 25(2):165-175.
- 174 Sakkiah, S.; Ng, H.W.; Tong, W.; Hong, H (2016). Structures of androgen receptor bound with ligands: Advancing understanding of biological functions and drug discovery. *Expert Opin. Ther. Targets* 2016, 20, 1267–1282.
- 175 Sathyanarayana S, Alcedo G, Saelens BE, Zhou C, Dills RL, Yu J et al. (2013). Unexpected results in a randomized dietary trial to reduce phthalate and bisphenol A exposures. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2013; 23: 378–384.
- 176 SCCS (2018). SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 10th revision, 24-25 October 2018, SCCS/1602/18.
- 177 Seeger B, Klawonn F, Bekale BN, Steinberg P (2016). The ability of the YAS and AR CALUX assays to detect the additive effects of anti-androgenic fungicide mixtures. *Toxicol Lett.* 2016 Jan 22;241:193-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.11.015. Epub 2015 Nov 19.

- 178 Serrano SE, Braun J, Trasande L, Dills R, Sathyanarayana S. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. *Environ Health*. 2014 Jun 2;13(1):43. doi: 10.1186/1476-069X-13-43.
- 179 Shannon M, Rehfeld A, Frizzell C, Livingstone C, McGonagle C, Skakkebaek NE, Wielogórska E, Connolly L (2016). *In vitro* bioassay investigations of the endocrine disrupting potential of steviol glycosides and their metabolite steviol, components of the natural sweetener Stevia. *Mol Cell Endocrinol*. 427: 65–72.
- 180 SCHER, SCCS, SCENIHR (2012). Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. European Commission Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS).
- 181 Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Nov;127(3-5):204-15. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.08.007.
- 182 Schutte K, Szczepanska A, Halder M, Cussler K, Sauer UG, Stirling C, Uhrich S, Wilk-Zasadna I, John D, Bopst M, Garbe J, Glansbeek HL, Levis R, Serreyn PJ, Smith D, Stickings P (2017). Modern science for better quality control of medicinal products "Towards global harmonization of 3Rs in biologicals": The report of an EPAA workshop. *Biologicals*. 2017 Jul;48:55-65. doi: 10.1016/j.biologicals.2017.05.006.
- 183 Siddiqui IA, Asim M, Hafeez BB, Adhami VM, Tarapore RS, Mukhtar H (2011). Green tea polyphenol EGCG blunts androgen receptor function in prostate cancer *FASEB J*. 2011 Apr;25(4):1198-207. doi: 10.1096/fj.10-167924. Epub 2010 Dec 21.
- 184 Sifakis S, Androutopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA (2017). Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environ Toxicol Pharmacol*. 51:56-70.
- 185 Silbernagl S, Despopoulos A (2004). Atlas fyziologie člověka. 6. vydání. Praha : Grada, 2004. 435s. ISBN 80-247-0630-X.
- 186 Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A (2002). Something from “nothing” – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol*. 36: 1751–1756.
- 187 Skinner MK (2014). Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Dec;398(1-2):4-12. doi: 10.1016/j.mce.2014.07.019.
- 188 Slíva J (2010). Receptory pro estrogen a strukturně obdobné molekuly [online]. *Moderní babičtví* 19: 2010. Dostupné online 12. 3. 2019: <https://www.levret.cz/publikace/casopisy/mb/2010-19/?pdf=103>.
- 189 Slíva J, Patočková J (2007). Lékové interakce grapefruitové šťávy a vybraných fytofarmak. *Zdraví a medicína. Aktuality*. 2007. Dostupné online 12. 3. 2019: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/lekove-interakce-grapefruitove-stavy-a-vybranych-fytofarmak-300320>
- 190 Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, Manna PR, Skobowiat C, Zmijewski M, Li W, Janjetovic Z, Postlethwaite A, Zouboulis CC, Tuckey RC (2013). Steroidogenesis in the skin: implications for local immune functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 Sep;137:107-23. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.02.006.
- 191 Sohoni P, Sumpster JP (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol*. 1998 Sep;158(3):327-39.
- 192 Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci*. 2005 Jan;83(1):136-48. Epub 2004 Oct 13.
- 193 Soucek P, Borovanova T, Pohlreich P, Kleibl Z, Novotny J (2006). Role of single nucleotide polymorphisms and haplotypes in BRCA1 in breast cancer: Czech case-control study. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Jun;103(2):219-24. Epub 2006 Oct 13.

- 194 Takeuchi T1, Nishii O, Okamura T, Yaginuma T. Effect of paeoniflorin, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on ovarian androgen production. *Am J Chin Med.* 1991;19(1):73-8.
- 195 Tateoka Y (2015). Bisphenol A Concentration in Breast Milk following Consumption of a Canned Coffee Drink. *J Hum Lact.* 2015 Aug;31(3):474-8. doi: 10.1177/0890334414563732. Epub 2014 Dec 17.
- 196 Teeguarden JG, Twaddle NC, Churchwell MI, Yang X, Fisher JW, Seryak LM, Doerge DR (2015). 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicol Appl Pharmacol.* 288(2): 131–142.
- 197 Thayer KA, Taylor KW, Garantzotis S, Schurman SH, Kissling GE, Hunt D, et al. (2015). Bisphenol A, Bisphenol S, and 4-Hydroxyphenyl 4-Isopropoxyphenyl sulfone (BPSIP) in Urine and Blood of Cashiers. *Environ Health Perspect.* 124(4): 437–44.
- 198 Thomas P, Converse A, Berg HA (2018). ZIP, a novel membrane androgen receptor and zinc transporter protein. *Gen Comp Endocrinol.* 2018 Feb 1;257:130-136. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.04.016.
- 199 Thomas P, Pang Y, Dong J (2017). Membrane androgen receptor characteristics of human ZIP9 (SLC39A) zinc transporter in prostate cancer cells: Androgen-specific activation and involvement of an inhibitory G protein in zinc and MAP kinase signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 May 15;447:23-34. doi: 10.1016/j.mce.2017.02.025.
- 200 Thongon N, Boonmuen N, Suksen K, Wichit P, Chairoungdua A, Tuchinda P, Suksamrarn A, Winuthayanon W, Piyachaturawat P (2017). Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM)-like Activities of Diarylheptanoid, a Phytoestrogen from *Curcuma comosa*, in Breast Cancer Cells, Pre-osteoblast Cells, and Rat Uterine Tissues. *J Agric Food Chem.* 2017 May 3;65(17):3490-3496. doi: 10.1021/acs.jafc.7b00769.
- 201 Tichý M, Rucki M (2009). Validation of QSAR models for legislative purposes. *Interdiscip Toxicol.* 2009 Sep;2(3):184-6. doi: 10.2478/v10102-009-0014-2. Epub 2009 Sep 28.
- 202 Trantham-Davidson H, Burnett EJ, Gass JT, Lopez MF, Mulholland PJ, Centanni SW, Floresco SB, Chandler LJ (2014). Chronic alcohol disrupts dopamine receptor activity and the cognitive function of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2014 Mar 5;34(10):3706-18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0623-13.2014.
- 203 Trasande L, Attina TM, Blustein J (2012). Association Between Urinary Bisphenol A Concentration and Obesity Prevalence in Children and Adolescents. *JAMA.* 308(11): 1113–1121.
- 204 Tyrrell J, Melzer D, Henley W, Galloway TS, Osborne NJ (2013). Associations between socioeconomic status and environmental toxicant concentrations in adults in the USA: NHANES 2001-2010. *Environ Int.* 2013 Sep;59:328-35. doi: 10.1016/j.envint.2013.06.017.
- 205 Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Kavvalakis MP, Barmpas M, Kokkinakis EN, Xenos K et al. (2015). Biomonitoring of bisphenol A in hair of Greek population. *Chemosphere.* 118: 336–41.
- 206 van den Hazel P, Zuurbier M, Babisch W, Bartonova A, Bistrup ML, Bolte G, Busby C, Butter M, Ceccatelli S, Fucic A, Hanke W, Johansson C, Kohlhuber M, Leijds M, Lundqvist C, Moshhammer H, Naginiene R, Preece A, Ronchetti R, Salines G, Saunders M, Schoeters G, Stilianakis N, ten Tusscher G, Koppe JG (2006). Today's epidemics in children: possible relations to environmental pollution and suggested preventive measures. *Acta Paediatr Suppl.* 2006 Oct;95(453):18-25.
- 207 Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, Schoenfelder G (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 118: 1055–1070.
- 208 Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, et al. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* 33: 378–455. Doi

- 209 Vandenberg LN, Ehrlich S, Belcher SM, Ben-Jonathan N, Dolinoy DC, Hugo ER, et al (2013). Low dose effects of bisphenol A. *Endocrine Disruptors*. 1(1): e26490. 64
- 210 Vandenberg LN (2014). Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol A as a case study. *Dose Response*. 12: 259–276. 65
- 211 Varshavsky JR, Morello-Frosch R, Woodruff TJ, Zota AR (2018). *Environ Int*. 2018 Jun;115:417-429. doi: 10.1016/j.envint.2018.02.029. Epub 2018 Mar 29. Dietary sources of cumulative phthalates exposure among the U.S. general population in NHANES 2005-2014.
- 212 Vápenka L, Vavrouš A, Votavová L, Kejlová K, Dobiáš J, Sosnovcová J (2016). Contaminants in the paper-based food packaging materials used in the Czech Republic. *Journal of Food and Nutrition Research (ISSN 1336-8672) Vol. 55, 2016, No. 4, pp. 361–373*
- 213 Vejdovsky K, Hahn K, Braun D, Warth B, Marko D (2016). Synergistic estrogenic effects of *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins *in vitro*. *Arch Toxicol*. 2017 Mar;91(3):1447-1460. doi: 10.1007/s00204-016-1795-7.
- 214 Velázquez-Gómez M, Hurtado-Fernández E, Lacorte S. Comprehensive method for the analysis of multi-class organic micropollutants in indoor dust (2018). *Sci Total Environ*. 2018 Sep 1;635:1484-1494. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.186. Epub 2018 Apr 25.
- 215 Vineis P, Kriebel D (2006). Causal models in epidemiology: past inheritance and genetic future. *Environ Health*. 2006 Jul 21;5:21.
- 216 Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J (2014). "The many faces of estrogen signaling". *Biochemia Medica*. 24 (3): 329–42.
- 217 Vymetalkova V, Soucek P, Kunicka T, Jiraskova K, Brynychova V, Pardini B, Novosadova V, Polivkova Z, Kubackova K, Kozevnikovova R, Ambrus M, Vodickova L, Naccarati A, Vodicka P (2015). Genotype and Haplotype Analyses of TP53 Gene in Breast Cancer Patients: Association with Risk and Clinical Outcomes. *PLoS One*. 2015 Jul 30;10(7):e0134463. doi: 10.1371/journal.pone.0134463. eCollection 2015.
- 218 Wagner RL, Huber BR, Shiao AK, Kelly A, Cunha Lima ST, Scanlan TS, Apriletti JW, Baxter JD, West BL, Fletterick RJ (2001). Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol*. 15(3):398-410.
- 219 Wallner P, Kundi M, Hohenblum P, Scharf S, Hutter HP (2016). Phthalate Metabolites, Consumer Habits and Health Effects *Int J Environ Res Public Health*. 2016 Jul; 13(7): 717. Published online 2016 Jul 15. doi: 10.3390/ijerph13070717
- 220 Waraich RS, Mauvais-Jarvis F (2013). Paracrine and intracrine contributions of androgens and estrogens to adipose tissue biology: physiopathological aspects. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2013 Aug;14(2):49-55. doi: 10.1515/hmbci-2013-0022.
- 221 Williams GP, Darbre PD (2019). Low-dose environmental endocrine disruptors, increase aromatase activity, estradiol biosynthesis and cell proliferation in human breast cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2019 Feb 26. pii: S0303-7207(19)30062-0. doi: 10.1016/j.mce.2019.02.016. [Epub ahead of print]
- 222 Wilson CM, McPhaul MJ (1994). A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (4): 1234–8. doi:10.1073/pnas.91.4.1234.
- 223 Wuttke W, Jarry H, Becker T, Schultens A, Christoffel V, Gorkow C, Seidlová-Wuttke DV (2003). Phytoestrogens: endocrine disruptors or replacement for hormone replacement therapy ? *Maturitas*. 2003 Mar 14;44 Suppl 1:S9-20
- 224 Xenometrix (2015). *XenoScreen YES/YAS Instructions for Use*. Version 3.03, November 2015, p.1–22.
- 225 Xenometrix (2017). *XenoScreen XL YES/YAS Instructions for Use*. Version 3.07, May 2017, p.1–22.

- 226 Yang L, Zhou B, Zha J, Wang Z (2016). Mechanistic study of chlordecone-induced endocrine disruption: Based on an adverse outcome pathway network. *Chemosphere*. 2016 Oct;161:372-381. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.034.
- 227 Yang NJ, Hinner MJ (2015). Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. *Methods Mol Biol*. 1266:29–53
- 228 Yang T, Doherty J, Zhao B, Kinchla AJ, Clark JM, He L (2017). Effectiveness of Commercial and Homemade Washing Agents in Removing Pesticide Residues on and in Apples. *J Agric Food Chem*. 2017 Nov 8;65(44):9744-9752. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03118.
- 229 Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ, Evans RM (2006). Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):801-10
- 230 Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*. 82(2011): 424–430.
- 231 Zamrazil V (2010). Neuroendokrinní systém a jeho význam. *Neuroendokrinní tumory. Zdravotnictví a medicína. Oborové speciály; Endokrinologie*. [online: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/neuroendokrinni-system-a-jeho-vyznam-neuroendokrinni-tumory-452347>, přístup 2. 1. 2019]
- 232 Zhang DW, Wang ZL, Qi W, Zhao GY (2014)1. The effects of *Cordyceps sinensis* phytoestrogen on estrogen deficiency-induced osteoporosis in ovariectomized rats. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Dec 13;14:484. doi: 10.1186/1472-6882-14-484.
- 233 Zhao B, Bohonowych JES, Timme-Laragy A, Jung D, Affatato AA, et al. (2013). Common Commercial and Consumer Products Contain Activators of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. *PLoS ONE*. 8(2): e56860.
- 234 Zoeller RT, Bansal R, Parris C (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist *in vitro*, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology*. 146: 607–612.
- 235 Zota AR, Phillips CA, Mitro SD (2016). Recent Fast Food Consumption and Bisphenol A and Phthalates Exposures among the U.S. Population in NHANES, 2003-2010. *Environ Health Perspect*. 2016 Oct;124(10):1521-1528.

11. Seznam internetových zdrojů

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000091831-ESR1/tissue>)

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169083-AR/tissue>

https://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?br08006.keg

<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/methods/endocrine/bg1luc/bg1luc-vm7luc-june2016-508.pdf>

https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2019_english_prohibited_list.pdf

<http://fbt.cz/skripta/>

<https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/gen-pro-androgenni-receptor-a-muzska-neplodnost-169655>

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report_mixture_toxicity.pdf

<http://www.remedia.cz/Clanky/Kazuistiky/Exogenni-Cushinguv-syndrom-po-lecbe-intranazalnimi-kortikosteroidy-u-ctrnactilete-divky/6-ah-1oT.magarticle.aspx>

https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/TB4_Application_manual_F1.compressed.pdf

<https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/neuroendokrinni-system-a-jeho-vyznam-neuroendokrinni-tumory-452347>

<https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/lekove-interakce-grapefruitove-stavy-a-vybranych-fytofarmak-300320>

<https://www.levret.cz/publikace/casopisy/mb/2010-19/?pdf=103>

12. Seznam obrázků

Obr. 1. Steroidní signalizace skrze membránové a jaderné estrogenové receptory v ováriích. ED mohou nahrazovat E2 ve steroidní signalizaci a tak ovlivňovat celou řadu vzájemně propojených drah a v důsledku i expresi genů pro regulátory buněčného cyklu, pro-apoptické proteiny, molekuly buněčné adheze. (KEGG database, 5/3/2019).

Obr. 2. Steroidní signalizace skrze androgenový receptor v prostatě. ED mohou nahrazovat „Testosterone, Dihydrotestosterone“ ve steroidní signalizaci a tak ovlivňovat buněčnou proliferaci a přežívání. (KEGG database, 5/3/2019).

13. Seznam tabulek

Tabulka 1. Seznam chemických látek pro identifikaci jejich endokrinního potenciálu

Tabulka 2. Seznam vzorků ubrousků.

Tabulka 3. Seznam spotřebních výrobků na bázi plastu.

Tabulka 4. Seznam kosmetických přípravků.

Tabulka 5. Seznam doplňků stravy.

Tabulka 6. Seznam analytů stanovených v 96 vzorcích moči.

Tabulka 7. Harmonogram, čas odběru a označení odběrů moči.

Tabulka 8. Analyty sledované ve vzorcích moči.

Tabulka 9. Výsledky predikce estrogenní aktivity pomocí OECD QSAR Toolbox.

Tabulka 10. Potenciál endokrinní disrupce látek ze skupiny bisfenolů a ftalátů kategorizovaný podle síly odezvy, identifikované dle závislosti hodnot RLU (relativní světelné jednotky) a OD_{570} (optické density měřené jako redukce rozptylu světla při 570 nm) na koncentraci.

Tabulka 11. Potenciál endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru identifikovaný na základě indukčního poměru (vypočteného jako $1/\text{růstový faktor} \times \text{čistá absorbance } OD_{570} - OD_{690} / \text{čistá absorbance kontroly rozpouštědla při } 570 \text{ nm} - 690 \text{ nm}$).

Tabulka 12. Potenciál endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi plastu – shrnutí.

Tabulka 13. Potenciální endokrinní aktivita vzorků kosmetických přípravků – shrnutí. Kosmetické přípravky nejčastěji vykazovaly anti-androgenní aktivitu (antagonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru) nebo anti-estrogenní aktivitu (antagonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α).

Tabulka 14. Potenciální endokrinní aktivita vzorků doplňků stravy – shrnutí.

Tabulka 15. Základní statistické ukazatele vyplývající ze základního statistického zhodnocení výsledků analýzy 96 vzorků moči. Nejvyšší hodnoty i četnost detekce u látek ze skupiny ftalátů byly zjištěny u MEP, MiBP, MnBP. Nejvyšší hodnoty i četnost detekce u látek ze skupiny bisfenolů byly zjištěny u BPA. Z výsledků vyplývá, že četnost detekce i zjištěné koncentrace u bisfenolů jsou mnohem nižší než u ftalátů. U BPS i BPF jde o ojedinělé nálezy. Vysoké hodnoty (u MEP, MnBP) naznačují vysoké koncentrace diethyl ftalátu (DEP) a dibutyl ftalátu (DBP) v prostředí. Hodnoty Percentilu 75 a 95 naznačují, že vysoké hodnoty ftalátů mohou být detekovány cca u 25 % vzorků moči.

Tabulka 16. Základní statistické ukazatele hodnot (FÁZE I).

Tabulka 17. Základní statistické ukazatele hodnot (FÁZE II).

14. Seznam grafů

Graf 1. Agonistická aktivita na estrogenový receptor α u látek ze skupiny bisfenolů vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (17 β -estradiol).

Graf 2. Agonistická aktivita na estrogenový receptor α u látek ze skupiny ftalátů vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (17 β -estradiol).

Graf 3. Agonistická aktivita extraktu spotřebního výrobku na bázi papíru vůči androgenovému receptoru, vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (5 α -dihydrotestosteron (DHT)).

Graf 4. Antagonistická aktivita extraktu spotřebního výrobku na bázi plastu vůči estrogenovému receptoru α , vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (4-Hydroxytamoxifen).

Graf 5. Antagonistická aktivita extraktu spotřebního výrobku na bázi plastu vůči androgenovému receptoru, vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (Flutamid).

Graf 6. Antagonistická aktivita extraktů kosmetických přípravků vůči estrogenovému receptoru α , vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (4-Hydroxytamoxifen).

Graf 7. Antagonistická aktivita extraktů kosmetických přípravků vůči androgenovému receptoru v nejvyšší testované koncentraci (vzorek Hemp elixír, vzorek Kolínská), vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (Flutamid).

Graf 8. Slabá agonistická aktivita u nejvyšší testované koncentrace kosmetického přípravku (parfémované vody č. 6) vůči estrogenovému receptoru α , vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (17 β -estradiol).

Graf 9. Antagonistická aktivita kosmetických přípravků s vysokým obsahem vonných složek (parfémované vody č. 2 a pánského deodorantu č. 5) vůči estrogenovému receptoru α , vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (4-Hydroxytamoxifen).

Graf 10. Antagonistická aktivita kosmetických přípravků s vysokým obsahem vonných složek (parfémované vody č. 1, 2, 3, 5) vůči androgenovému receptoru, vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (Flutamid); (vzorek parfémované vody č. 4 vykazoval negativní aktivitu a vzorek 3 slabou antagonistickou aktivitu).

Graf 11. Antagonistická aktivita kosmetických přípravků s vysokým obsahem vonných složek (parfém pro ženy s deklarovaným obsahem feromonu č. 7, parfém pro muže s deklarovaným obsahem feromonu č. 8) vůči androgenovému receptoru, vyjádřené křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (Flutamid). Slabší aktivitu (v nejvyšší testované koncentraci) vykazoval vzorek arganového oleje, vzorek toaletní vody č. 9 a vzorek parfémované vody č. 6.

Graf 12. Agonistická aktivita doplňků stravy ze sortimentu výrobků tradiční čínské medicíny s deklarovaným obsahem bylinných složek (vzorek 3, vzorek 6) vůči estrogenovému receptoru α ,

vyjádřené křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (17 β -estradiol). Velmi slabou estrogenní aktivitu (v nejvyšší testované koncentraci) vykazoval vzorek 5.

Graf 13. Antagonistická aktivita doplňku stravy ze sortimentu výrobků tradiční čínské medicíny s deklarovaným obsahem bylinných složek vůči androgenovému receptoru, vyjádřená křivkou závislosti na koncentraci, ve srovnání s pozitivní kontrolou (Flutamid). Slabou aktivitu vykazoval vzorek 1, silnější aktivitu (v nejvyšší testované koncentraci) vykazoval vzorek 3.

Graf 14. Zjištěné koncentrace ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u bisfenolu A (BPA), bisfenolu S (BPS) a bisfenolu F (BPF) v 96 vzorcích ranní moči. Vzorky jsou seřazeny od nejnižší do nejvyšší koncentrace. První pozitivní vzorek, ve kterém byl detekován BPA má číslo 70. První pozitivní vzorek, ve kterém byl detekován BPF, má číslo 94. BPS byl detekován pouze v jediném vzorku moči č. 96. Ve vzorcích 1 – 69 byly koncentrace bisfenolů nižší než byl limit kvantifikace analytické metody ($<\text{LOQ}$). Jako prediktivní indikátor expozice bisfenolům je možno využít BPA, vzhledem k ojedinělým nálezům BPF a BPS je však vhodné monitorovat i tyto analyty, z důvodu jejich možného využívání jako náhrad BPA.

Graf 15. Zjištěné koncentrace ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u monoethyl ftalátu (MEP), mono isobutyl ftalátu (MiBP), monobutyl ftalátu (MnBP), 5-oxo-monoethyl hexyl ftalátu (5-oxo MEHP) a 5-hydroxy-monoethyl hexyl ftalátu (5-OH MEHP) v 96 vzorcích ranní moči. Vzorky jsou seřazeny od nejnižší do nejvyšší koncentrace. Jako prediktivní indikátory expozice ftalátům je možno využít monoethyl ftalát (MEP), mono butyl ftalát (MnBP) a mono isobutyl ftalát (MiBP).

Graf 16. Detail zjištěných koncentrací 0 - 250 ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u monoethyl ftalátu (MEP), mono isobutylftalátu (MiBP), monobutyl ftalátu (MnBP), 5-oxo-monoethyl hexyl ftalátu (5-oxo MEHP) a 5-hydroxy monoethylhexylftalátu (5-OH MEHP) v 96 vzorcích ranní moči. Vzorky jsou seřazeny od nejnižší do nejvyšší koncentrace. Ve všech vzorcích moči byly identifikovány některé z metabolitů ftalátů. Jako prediktivní indikátory expozice ftalátům lze využít MEP, MnBP a MiBP, které se vyskytovaly téměř ve všech vzorcích.

Graf 17., 18., 19., 20. Detail zjištěných koncentrací ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u monoethyl ftalátu (MEP), mono isobutyl ftalátu (MiBP) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci MEP a MiBP. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Zajímavé je, že ojedinělé vysoké hodnoty korelují s prostředím (domácností), např. u MiBP v obou fázích studie.

Graf 21., 22., 23., 24. Detail zjištěných koncentrací ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u monobutyl ftalátu (MnBP) a mono(2-ethyl-5-oxohexyl)ftalátu (5-oxo-MEHP) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci ftalátů. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Zajímavé je, že ojedinělé vysoké hodnoty korelují s prostředím (domácností), např. ve Fázi II – u 5-oxo-MEHP.

Graf 25., 26., 27., 28. Detail zjištěných koncentrací ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u monobenzyl ftalátu (MBzP) a mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)ftalátu (5-OH-MEHP) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají

kontinuální expozici i efektivní eliminaci ftalátů. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí od účastníků ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Zajímavé je, že ojedinělé vysoké hodnoty korelují s prostředím (domácností), např. ve Fázi II – u 5-OH-MEHP (křivka 1001, 1002).

Graf 29., 30. Detail zjištěných koncentrací ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u mono ethylhexyl ftalátu (MEHP) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci ftalátů. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí od účastníků ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Zajímavé je, že ojedinělé vysoké hodnoty korelují s prostředím (domácností), např. ve Fázi II – u MEHP (křivka 1001, 1002).

Graf 31., 32., 33., 34. Detail zjištěných koncentrací ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u bisfenolu A (BPA) a bisfenolu F (BPF) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci bisfenolů. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí od účastníků ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Zajímavé je, že ojedinělé vysoké hodnoty korelují s prostředím (domácností), např. ve Fázi I – u BPA (křivky 1003, 1005) a ve Fázi II (křivky 1001, 1002). Vysoké hodnoty BPF (Fáze I, křivka 1001, odběr 1) naznačují ojedinělou přítomnost BPF v prostředí.

Graf 35., 36. Detail zjištěných koncentrací ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u bisfenolu A (BPA) a bisfenolu F (BPF) v kontinuálně odebíraných vzorcích moči (1-10) během 4 dnů. Identifikace časů odběru je uvedena v tabulce 7. (Harmonogram, identifikace času odběru a označení odběrů moči). Nejvyšší hodnoty jsou označeny popiskem. Křivky dokládají kontinuální expozici i efektivní eliminaci bisfenolů. Odběry označené křivkami 1001, 1002 a dále 1003, 1004, 1005, 1006 pocházejí od účastníků ze stejného prostředí (celkem 2 domácnosti). Jediná pozitivní hodnota ve Fázi II (křivka 1002, odběr 5) naznačuje ojedinělou přítomnost BPS v prostředí.

15. Seznam příloh

Publikované práce související s tématem disertační práce:

Příloha č. 1:

Dvořáková M, Kejlová K, Bendová H, Rucki M, Kohout P, Vavrouš A, Jírová D. **Alternative methods *in vitro* for screening of endocrine disruptors.** Neuro Endocrinol Lett. 2016 Dec 18;37(Suppl1):123-131. [IF (2016): 0,918] 85 %*)

Pozn.: *) Podíl autora v % na jednotlivých aspektech díla: přípravě projektu 70%, provádění prací 80%, interpretaci výsledků 100% a přípravě publikace 90%.

Příloha č. 2:

Dvořáková M, Kejlová K, Rucki M, Jírová D. **Selected bisphenols and phthalates screened for estrogen and androgen disruption by *in silico* and *in vitro* methods.** Neuro Endocrinol Lett. 2018 Dec;39(5):409-416. [IF (2017): 0,754] 85 %*)

Pozn.: *) Podíl autora v % na jednotlivých aspektech díla: přípravě projektu 60%, provádění prací 90%, interpretaci výsledků 100% a přípravě publikace 90%.

Příloha č. 3:

Kejlová K, Dvořáková M, Vavrouš A, Ševčík V, Kandárová H, Letašiová S, Sosnovcová J, Jírová D. **Toxicity of food contact paper evaluated by combined biological and chemical methods.** Toxicol *In vitro* . 2019 Apr 2;59:26-34. doi: 10.1016/j.tiv.2019.04.001. [Epub ahead of print] [IF (2017): 3,105] 45 %*)

Pozn.: *) Podíl autora v % na jednotlivých aspektech díla: přípravě projektu 40%, provádění prací 40%, interpretaci výsledků 50% a přípravě publikace 50%.

Abstrakta ve sbornících, postery a přednášky vztahující se k tématu disertační práce:

Příloha č. 4:

Dvořáková M., Kejlová K., Rucki M., Jírová D. Selected bisphenols and phthalates screened for estrogen and androgen disruption by *in silico* and *in vitro* methods. *Interdisciplinary Toxicology*, Vol. 11(1):2018, p. 66. ISSN 1337-6853. (Abstrakt ve sborníku, přednáška v angličtině).

Příloha č. 5:

Marketa Dvorakova^{1,2}, Kristina Kejlova¹, Marian Rucki¹, Hana Bendova¹, Pavel Kohout³, Jitka Tomesova³ and Dagmar Jirova^{1,2} (2016). Screening of endocrine disruptors and their impact on human health. *ALTEX*, Vol. 5, No. 1, 2016. Proceedings of EUSAAT 2016 - 20th European Congress on Alternatives to Animal Testing. (Abstrakt ve sborníku, poster “Screening of endocrine disruptors and their impact on human health.”).

Příloha č. 6:

Markéta Dvořáková, Kristina Kejlová, Hana Bendová, Marian Rucki, Adam Vavrouš, Dagmar Jírová. Identification of potential endocrine disruptors using alternative methods. Poster. *Toxicol Lett.* 2017 October 280:S166. (Abstrakta 53. ročníku kongresu: EUROTOX Congress 2017: Connecting for a Safer Future.) (Abstrakt, poster “Identification of potential endocrine disruptors using alternative methods according to 3R principles”).

Příloha č. 7:

Marketa Dvorakova, Kristina Kejlova, Hana Bendova, Marian Rucki, Adam Vavrouš, Dagmar Jírová. Identification of potential endocrine disruptors using alternative methods according to 3R principles. *ALTEX Proceedings* 6(1), 2017. Abstracts of the 10th World Congress 2017, Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: 3Rs in Action. ISSN 2194-0479. (Abstrakt ve sborníku, poster shodný jako v Příloze č. 6).

Příloha č. 8:

Dvořáková Markéta; Kejlová Kristina; Rucki Marian; Bendová Hana ; Jírová Dagmar. Sledování vlivu endokrinních disruptorů na zdraví člověka. Program & sborník abstrakt ze Studentské vědecké konference 2017, s. 176-177. Studentská vědecká konference 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. (Abstrakt ve sborníku, poster shodný jako v Příloze č. 6).

PŘÍLOHY

Alternative methods *in vitro* for screening of endocrine disruptors

Markéta DVOŘÁKOVÁ^{1,2}, Kristina KEJLOVÁ², Hana BENDO VÁ², Marian RUCKI², Pavel KOHOUT³, Jitka TOMĚŠOVÁ³, Adam VAVROUŠ², Dagmar JÍROVÁ²

¹ Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

² National Institute of Public Health, Centre of Toxicology and Health Safety, Prague, Czech Republic

³ Thomayer's Hospital, Prague, Czech Republic

Correspondence to: Markéta Dvořáková, MSc.
National Institute of Public Health, Centre of Toxicology and Health Safety,
Šrobárova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic.
TEL: +420 267082327; FAX: +420 267082386; E-MAIL: marketa.dvorakova@szu.cz

Submitted: 2016-06-24 Accepted: 2016-10-30 Published online: 2016-12-18

Key words: endocrine disruption; bisphenol A; bisphenol analogues; alternative methods *in vitro*; chemicals

Neuroendocrinol Lett 2016; 37(Suppl. 1):123–131 PMID: 28263540 NEL370916A15 ©2016 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

Abstract

OBJECTIVES: The aim of this study was to compare *in silico* data with results obtained in two alternative *in vitro* methods; and to investigate the potential endocrine activity of bisphenol A analogues. This article contributes to recent findings and brings up-to-date information on development of EU legislation and *in vitro* testing methods of endocrine disruption.

METHODS: *In silico* approach based on the OECD QSAR Toolbox was used for prediction of potential ligands of human estrogen receptor α . Estrogen Receptor Transactivation *in vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists (OECD TG 455/457) using the VM7Luc4E2 (formerly designated BG1Luc4E2) cell line was performed for measurement of transactivation activity of the tested substances. Commercially available yeast-based microplate assay (XenoScreen YES/YAS, Xenometrix, Switzerland) for detection of compounds with estrogenic and androgenic agonistic/antagonistic activity was used as a comparative test to estrogen receptor transactivation assay (OECD TG 455/457) and for screening of the agonistic/antagonistic potential of human estrogen receptor and agonistic/antagonistic activity of tested compounds on human androgen receptor.

RESULTS: The study showed good correlation between the two *in vitro* assays and significant correlation with *in silico* data. All tested substances were identified as agonists for human estrogen receptor α by methods *in silico* and *in vitro*, four substances showed a potentially higher estrogenic activity comparing to bisphenol A, two substances were identified as very weak antagonists of human androgen receptor and one compound showed a potential of agonistic activity to human androgen receptor.

CONCLUSIONS: The study contributes to recent findings and brings new *in silico* and *in vitro* data of bisphenol A analogues, revealing that these analogous substances should be further tested as they may show similar or higher activity *in vivo* comparing to bisphenol A, which has been recently legislatively regulated.

To cite this article: Neuroendocrinol Lett 2016; 37(Suppl. 1):123–131

household products, medical devices, packaging materials and other products used in industry or agriculture (Schlumpf *et al.* 2008; Yang *et al.* 2011; Dodson *et al.* 2012; Liao & Kannan 2014; Shannon *et al.* 2016; Wang *et al.* 2011; Rossi *et al.* 2016; Isidori *et al.* 2007; Orton *et al.* 2014). Certain chemicals have already been identified as endocrine disruptors and have been legislatively regulated (e.g. bisphenol A has been regulated in food contact materials in several EU countries; or aminotriazole, use of which within the EU has been banned after September 2017 on the grounds of potential groundwater contamination and risks to aquatic life; there have also been concerns about endocrine-disrupting properties). Effects of structural analogues of already known and legislatively regulated endocrine active substances on human receptors have been described in very recent studies (Roelofs *et al.* 2015; Eladak *et al.* 2015), showing similar order of magnitude, indicating that structural analogues of BPA, i.e. BPF and BPS, are not safer alternatives compared to BPA regarding their endocrine modulating capacity. The use of analogues has not been regulated, however, it has been described that BPS is used as a BPA alternative e.g. in “BPA-free” thermal printing paper (Liao *et al.* 2012a), BPF was found in foodstuff and BPS in urine samples (Liao *et al.* 2012a; Liao *et al.* 2012b; Liao & Kannan 2013; Liao & Kannan 2014). Possible additive effects of various analogous substances, e.g. bisphenols, should be considered as relevant regarding overall human exposure. At the international level, the improvement of testing strategies and new advanced testing methods is highly required and has been discussed in the context of EU and global legislation. Increasing pressure on testing of endocrine disruption potential in the near future is anticipated, along with efforts to reduce the potential exposure of humans, particularly of sensitive populations. This article summarizes the current development of international legislation for the evaluation of chemical substances in terms of endocrine disruption including the available up-to-date *in vitro* testing methods. It also brings *in silico* and *in vitro* data of a pilot study of bisphenol A analogues, showing that analogous substances should be further tested as they may show similar or even higher activity as the compounds recently legislatively regulated.

Regulatory concern and perspective for endocrine disruption in the European Union

The most effective way to reduce risk of human exposure to EDs is at the regulatory level. The regulatory networks in the European Union have been criticised to be ineffective. The WHO/IPCS (2002) scientific definition of endocrine disruptors has reached a consensus of EU public authorities: “An endocrine disruptor is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of endocrine system and consequently causes adverse effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations.” (European Chemicals Agency 2015a,

2015b, WHO 2002). According to REACH (Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, establishing a European Chemicals Agency), potential endocrine disruptors are considered as substances of very high concern (SVHC). The Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products introduced an automatic ban on CMR (carcinogenic, mutagenic, reprotoxic) substances beside exceptions with strict limitations. As a hazardous property of a substance does not necessarily always represent a risk, there is a possibility to allow the use of the substance classified as CMR where, in view of exposure and concentration, it has been found safe for use in cosmetic products by the SCCS (Scientific Committee for Consumer Safety) and is regulated by the European Commission in the Annexes to the Regulation. Validation of tests and test strategies for regulatory purposes have already been performed and set up. In June 2016, the European Commission published science-based criteria for EDs which will have a substantial impact on industrial chemicals, plant protection products and biocides. Joint Research Centre (JRC), the scientific service of the European Commission, presented the developed methodology for the screening of chemicals (Munn *et al.* 2015). Approximately 700 chemical substances have been screened against various ED criteria. The lists of screened chemicals include almost all EU approved pesticides (341 substances), biocides (96 substances) and about 200 other substances regulated by REACH, cosmetic regulations and the water framework regulation. The formal adoption and entry into force of final criteria is planned in 2017. The existing European Commission database of endocrine disruptors and testing methods was published at the EU Commission website. The database covered more than 400 substances with suspected potential of endocrine disruption. 130 reproductive toxicants covering different target cells and toxicological mechanisms, selected according predefined criteria and independently peer reviewed, which were used for the development of *in vitro* tests of ReProTect projects, are listed in a specific list: http://chelist.jrc.ec.europa.eu/?id=2&id_list=16.

OECD Test Guidelines programme

Development of non-animal test methods for the detection of endocrine disruptors has been confirmed as a high priority for regulatory authorities in most OECD countries. In 2012, the “Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption – Series on Testing and Assessment, No. 150” was issued (OECD, 2012a). The extensive document provides the background of each standardised assay, its applicability domain and conceptual framework for testing strategy. In 2012, a “Detailed review Paper on the State of the Science on Novel *in*

vitro and *in vivo* screening and testing methods and endpoints for evaluating endocrine disruptors, No. 178” was published (OECD, 2012b). In 2012, the “Adverse Outcome Pathway Development Programme” was launched as a central concept in future work at OECD on predictive toxicology, covered by the Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics (Programme on Chemical Safety). The OECD QSAR Project was initiated for the identification of new methods/profilers for grouping chemicals; with the aim to improve future testing and assessment needs (OECD, 2007).

In vitro testing of endocrine disruption

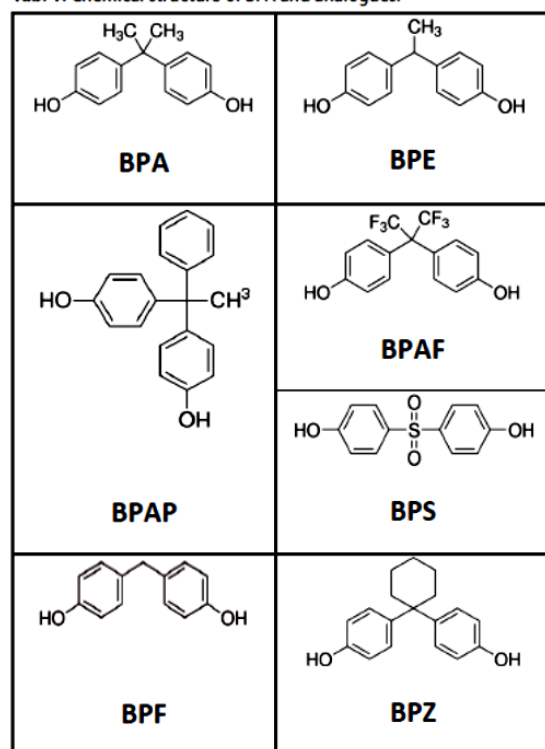
Although *in vitro* models and assays lack full metabolic and homeostatic relevance to human organism *in vivo*, they are indispensable for directing further testing and they are employed. Epigenetic assays using approaches of molecular biology focused on histone and cytosine methylation, transcriptional profiling of mRNAs, microRNAs and mRNA levels of methyltransferases and chromatin immunoprecipitation-based techniques seem suitable for testing complex effects of endocrine disruption (De Felice *et al.* 2015; Kundakovic *et al.* 2013). Cell cultures from phenotypically-affected organs (e.g. sperm, ovary, breast, prostate) are used as suitable substrates for testing of phenotypic effects. In accordance with the 3Rs principles, *in vitro* screening

studies should be preferably performed, in order to allow future reduction of numbers of experimental animals used in *in vivo* studies. Available OECD test guidelines that could potentially be adapted for epigenomic studies of endocrine disruption are e.g.:

- OECD TG 455/457 – Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists,
- OECD TG 456 – H295R Steroidogenesis Assay,
- MCF-7 Cell proliferation Assay (agonistic/antagonistic),
- OECD TG 236 – Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test with adaptation to zebrafish embryo epigenetic assay.

In vitro bioassays, e.g. Yeast Estrogen Screen (YES), Yeast Androgen Screen (YAS), Estrogen Receptor Transactivation Assays (ER TA), Androgen Receptor Transactivation Assays (AR TA), CALUX assays (Chemical Activated Luciferase gene eXpression), e.g. ER CALUX (Estrogen Receptor Chemical Activated Luciferase gene eXpression), AR CALUX (Androgen Receptor Chemical Activated Luciferase gene eXpression), are suitable for screening of endocrine activity. *In vitro* assays focused on activity of CYP family enzymes (e.g. CYP19), transferases (NAT, UGT, SULT, GST) and aromatases, and the use of relevant cell lines (e.g. H295R, a human steroid-producing cell line, isolated from adrenocortical carcinoma, used for OECD TG 456 – H295R Steroidogenesis Assay, MA-10, a Leydig cell line isolated from *Mus musculus*, CV-1 cell line derived from *Cercopithecus aethiops* monkey kidneys) are suitable for detecting the effects of xenobiotics on metabolism (OECD 2008). Chromatographic analyses (by GC-MS, HPLC-MS) are very reliable tools for detection of EDs in various types of samples (e.g. biological fluids, extracts, water) or their migration from e.g. packaging materials (Piecha *et al.* 2016; Mráz *et al.* 2016; Grafnetterová *et al.* 2015). Human relevant cell cultures which could be potentially used for *in vitro* screening of endocrine activity include e.g. MCF-7 cell line derived from a human breast adenocarcinoma, hERalpha-HeLa-9903 cell line derived from human cervical tumor, yeast cells (e.g. *S. cerevisiae*) with stably transfected human estrogen or androgen receptors (Greally & Jacobs 2013), Leydig cells, ovarian carcinoma cells. Reporter gene assays, H295R steroidogenesis assay and Ca²⁺ fluorimetry based assays using human sperm cells, optional primary cell cultures and organ explants, human embryonic stem cells as well as 2D or 3D model systems, human mammospheres and human microsomes may be promising (Zalko *et al.* 2011; Calderon-Gierszal and Prins 2015; Shannon *et al.* 2016). Biological fluids, e.g. urine, semen, serum, breast milk, colostrum, saliva, blood, biological samples of hair and adipose tissue, and tissues and cells of breast, ovaries, testes or skin have been used in studies relevant to humans (Müllerová & Kopecký 2007; Hamp

Tab. 1. Chemical structure of BPA and analogues.



et al. 2013; Hampf et al. 2016; Boucher et al. 2016; Tee-guarden et al. 2015; Tzatzarakis et al. 2015; Thayer et al. 2015; Goldstone et al. 2015; Den Hond et al. 2015; Mráz et al. 2016; Hormann et al. 2014; Dekant & Völkel 2008; Vandenberg et al. 2010; Trasande et al. 2012).

MATERIAL AND METHODS

Tested chemicals

Chemicals analogous to bisphenol A (BPA), i.e. BPAF, BPF, BPS, BPZ, BPE, BPAP (Sigma Aldrich) were tested in a pilot study for endocrine activity, comparing to BPA and relevant analytical standards (Methoxychlor, 17 β -estradiol, Sigma Aldrich). Chemical structure of the tested compounds is indicated in Table 1.

OECD QSAR Toolbox

In silico approach, using the OECD QSAR Toolbox (Toolbox 3.3.2 Release Notes) was used for prediction of potential ligands and their binding affinity to the estrogen receptor α based on the chemical structure, molecular weight and partition coefficient octanol-water of the screened compounds. OECD QSAR Toolbox, v. 3.3.2. database allows to categorize the screened compounds according to their binding affinity into groups, e.g. very strong binder, binder, non binder.

Estrogen Receptor Transactivation Assay (OECD TG 455/457)

A continuous human cell line VM7Luc4E2 (formerly designated BG1Luc4E2) with endogenous ER α , suitable for luciferase reporter gene assay (OECD TG 455/457) was kindly provided by Prof. Michael Denison, UC Davis, California, USA, for research purposes (Figure 1). The functional assay is based on binding of a tested substance to ER α . The culture and assay procedure was performed according to Rogers and Denison, with minor modifications (Rogers & Denison, 2000). In brief, cells were cultured in MEM α medium

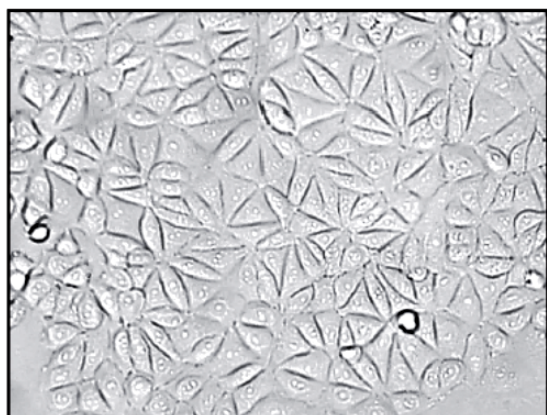


Fig. 1. VM7Luc4E2 (BG1Luc4E2) cell line, magnification 200x.

(Gibco), containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Five days prior analysis, cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium, estrogen stripped and phenol red free (Sigma Aldrich) with 8% charcoal stripped fetal bovine serum and 1.9% supplement of L-glutamine with daily media change. Cells were plated in 96-well plates (100 μ l per well) at a concentration of 500.000 cells/ml and incubated for 24 h (37°C, 5% CO₂). The next day the plated cells were treated with tested compounds in triplicates in selected concentrations (from 1.0*10E-07 to 1.0*10E-02 mg/ml) for 24 h (37°C, 5% CO₂). Luciferase Assay System (Promega) in combination with Promega Injector Luminometer was used for luminiscence measurement of activation the ER α by the tested substances.

Yeast based reporter gene assay (XenoScreen YES/YAS)

A commercially available yeast based microplate assay (XenoScreen YES/YAS, Xenometrix*, Switzerland) designed for detection of compounds with estrogenic and androgenic agonistic/antagonistic activities of chemicals, water samples and biological fluids, using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains with human estrogen (hER α) and androgen (hAR) receptors was used as a comparative test to Estrogen Receptor Transactivation Assay (OECD TG 455/457). The Yeast based reporter gene assay was performed according to the provided standard operating procedure, using the supplied standardized material and chemicals (in concentrations from 3.16*10E-08 to 1.0*10E-04 mol/L). The OD of the red product resulting from conversion of the yellow substrate after secretion of β -galactosidase was measured on Biotec Eon™ High Performance Microplate Spectrophotometer at 570 nm. The OD₅₇₀ of the end product in comparison with controls provides direct correlation with the endocrine activity of the tested substances.

RESULTS

In silico results obtained with the use of OECD QSAR Toolbox predicted all the screened compounds as very strong binders to ER α based on their chemical structure, molecular weight and partition coefficient

Tab. 2. QSAR prediction of ER α binding affinity.

Compound	CAS No.	ER α binding affinity
BPA	80-05-7	Very strong
BPAF	1478-61-1	Very strong
BPAP	1571-75-1	Very strong
BPE	2081-08-5	Very strong
BPF	620-92-8	Very strong
BPS	80-09-1	Very strong
BPZ	843-55-0	Very strong

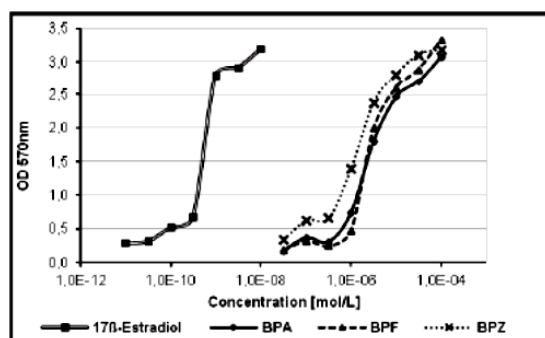


Fig. 2. Agonistic activity to human estrogen receptor α in XenoScreen[®] YES/YAS assay (β -Gal expression).

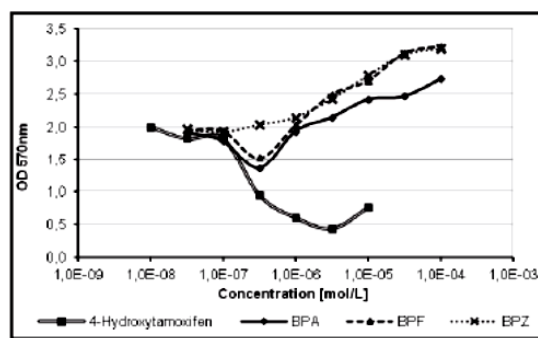


Fig. 3. Antagonistic activity to human estrogen receptor α in XenoScreen[®] YES/YAS assay (β -Gal expression).

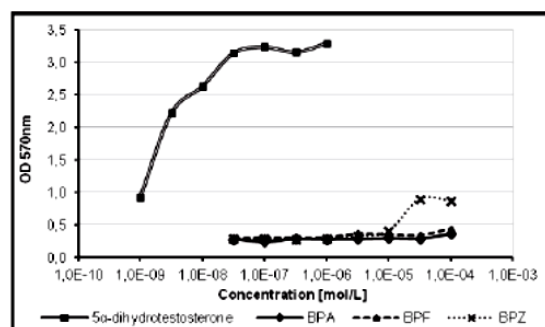


Fig. 4. Agonistic activity to human androgen receptor in XenoScreen[®] YES/YAS assay (β -Gal expression).

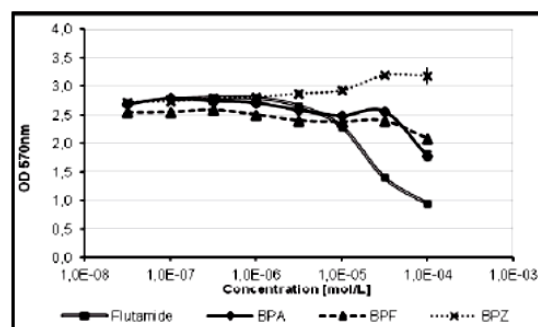


Fig. 5. Antagonistic activity to human androgen receptor in XenoScreen[®] YES/YAS assay (β -Gal expression).

octanol–water as indicated in Table 2. In two novel *in vitro* bioanalytical tests – Estrogen Receptor Transactivation Assay (ER TA, OECD TG 455/457), and the Yeast based reporter gene assay (XenoScreen YES/YAS), BPA and its analogues (BPAP, BPAF, BPE, BPF, BPS, BPZ, BPE, BPAP) showed similar estrogenic activity comparing to 17 β -estradiol (Figures 2, 6, 7). BPF and BPZ showed a potential of even higher estrogenic activity comparing to BPA in both *in vitro* assays (Figures 2, 6). BPAF in low concentrations showed a potential of even higher estrogenic activity comparing to BPA in ER TA (OECD TG 455/457) reporter gene assay (Figure 6). Significant antagonistic activity to human ER α was not clearly confirmed for any of the tested compounds in the Yeast based reporter gene assay (XenoScreen YES/YAS) comparing to 4-hydroxytamoxifen used as a positive control (Figure 3). BPZ showed a potential of weak agonistic activity to human AR while BPA and BPF were not identified as agonists of human AR in the Yeast based reporter gene assay comparing to 5 α -dihydrotestosterone as a positive control (Figure 4). BPA and BPF showed a potential of antagonistic activity to human AR comparing to flutamide as a positive control in the Yeast based reporter gene assay, and BPZ was not detected as an antagonist of human AR (Figure 5).

DISCUSSION

Using *in silico* approach and two novel *in vitro* toxicological methods alternative to animal experiments seven analogues of BPA (BPAP, BPAF, BPE, BPF, BPS, BPZ) were tested. In this limited study all of the tested analogous bisphenols showed similar dose-response estrogenic activity curve as BPA and similar activity as 17- β estradiol in very low concentrations. The data support recent findings that BPS, BPAF and BPF may display BPA-like activity in cell lines and tissues with weaker, equal or higher potency than BPA, depending on the employed *in vitro* model and selected endpoints (Eladak *et al.* 2015; Rochester & Bolden 2015; Goldinger *et al.* 2015; Molina-Molina *et al.* 2013; Cano-Nicolau, *et al.* 2016). Previous studies have shown that BPA exhibits multiple effects, e.g. both estrogen receptor agonistic activity and androgen receptor antagonistic activity *in vitro* and *in vivo* (Luccio-Camelo & Prins 2011; Rubin BS 2011; Paris *et al.* 2002). Results of this study indicate that BPA and BPF are agonists of human estrogen receptor α and to certain extent may antagonize human androgen receptor. Using the OECD QSAR Toolbox the tested BPA analogues, i.e. BPF, BPAF, BPS, BPZ, BPE, BPAP, were classified as very strong binders of human

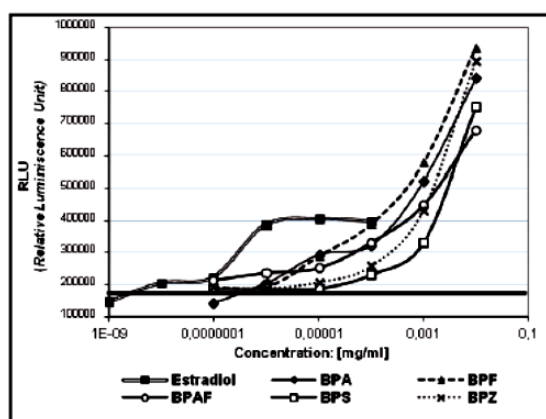


Fig. 6. Estrogenic activity of BPA and analogues in ER TA assay, OECD TG 455/457 (Luc gene expression).

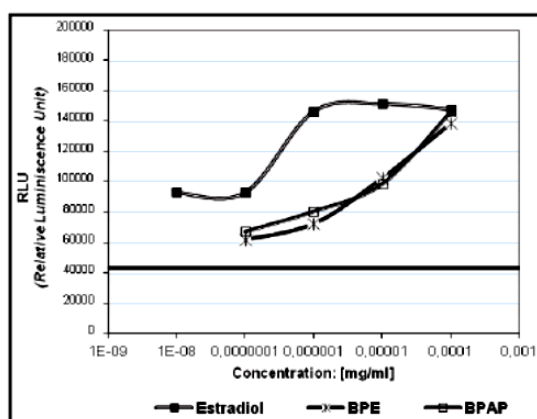


Fig. 7. Estrogenic activity of BPA and analogues in ER TA assay, OECD TG 455/457 (Luc gene expression).

estrogen receptor α , which is in accordance with previous observations that compounds with endocrine activity contain phenolic groups in para orientation with strongly reactive hydroxyl groups. Replacement of hydrogens in the methyl group by halogens (e.g. BPAF) may lead to enhancement of endocrine activity. With the use of long term knowledge about chemical structure activities it may be possible to develop useful analogous monomers of BPA with reduced endocrine activity (Coleman *et al.* 2003). Further testing of bisphenols containing multiple reactive alkyl substituents (e.g. bisphenol G, M, C, P, TMC) could contribute to clarification of their mechanisms of action in the endocrine system. Analogous chemicals, which are produced and available on the market, are suspected to be replacing those already regulated, e.g. BPA in thermal paper (Goldinger *et al.* 2015, Liao *et al.* 2012a), and thus should be of considerable interest for testing and evaluation. Chemicals with positive results in *in vitro* systems are suspected to cause adverse effects *in vivo* to living organisms in the environment and also to humans. Sensitive human populations should be instructed to avoid exposure to these pollutants, as many of them may be found in consumer products and in the environment (Liao *et al.* 2012a; Liao & Kannan 2013; Chen *et al.* 2016). Further testing of the presence of endocrine active substances and their metabolites with the use of human biological fluids should be performed and suitable strategies to monitor human exposure developed.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (National Institute of Public Health – NIPH, IN: 75010330).

REFERENCES

- Bernal AJ, Jirtle RL (2010). Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* **88**: 938–944.
- Boucher JG, Ahmed S, Atlas E (2016). Bisphenol S induces adipogenesis in primary human preadipocytes from female donors. *Endocrinology.* **157**: 1397–1407.
- Calderon-Gierszal EL, Prins GS (2015). Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Prostate Organoids *In vitro* and its Perturbation by Low-Dose Bisphenol A Exposure. *PLoS One.* **10**(7): e0133238.
- Cano-Nicolau J, Vaillant C, Pellegrini E, Charlier TD, Kah O, Coumilleau P (2016). Estrogenic Effects of Several BPA Analogs in the Developing Zebrafish Brain. *Front Neurosci.* **10**: 112.
- Coleman KP, Toscano WA, Wiese TE (2003). QSAR models of the *in vitro* estrogen activity of bisphenol A analogs. *QSAR Comb Sci.* **22**(1): 78–88.
- Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng YL, Wu Y, *et al.* (2016). Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environ. Sci. Technol.* **50**(11): 5438–5453.
- De Felice B, Manfellotto F, Palumbo A, Troisi J, Zullo F, Di Carlo C, *et al.* (2015). Genome-wide microRNA expression profiling in placentas from pregnant women exposed to BPA. *BMC Med Genomics.* **8**: 56.
- Dekant W, Völkel W (2008). Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol.* **228**: 114–134.
- Den Hond E, Tournaye H, De Sutter P, Ombelet W, Baeyens W, Covaci A, *et al.* (2015). Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case–control study in male subfertility patients. *Environ Int.* **84**: 154–160.
- Dodson RE, Nishioka M, Standley LJ, Perovich LJ, Brody JG, Rudel RA (2012). Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. *Environ Health Perspect.* **120**(7): 935–43.
- Eladak S, Grisin T, Moison D, Guerquin MJ, N'Tumba-Byn T, Pozzi-Gaudin S, *et al.* (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil Steril.* **103**(1): 0015–0282.
- European Chemicals Agency (2015a). Draft Community Rolling Action Plan (CoRAP) update for years 2016–2018. Helsinki, Finland.

- 13 European Chemicals Agency (2015b). Roadmap for SVHC Identification and Implementation of REACH Risk Management Measures; Annual Report, 23 March 2015; ECHA-15-R-04-EN; Catalogue number: ED-AP-15-001-EN-N, ISBN: 978-92-9247-292-4.
- 14 Goldinger DM, Demierre AL, Zoller O, Rupp H, Reinhard H, Magnin R. (2015). Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland. *Regul Toxicol Pharmacol.* **71**(3): 453–62.
- 15 Goldstone AE, Chen Z, Perry MJ, Kannan K, Louis GM (2015). Urinary bisphenol A and semen quality, the LIFE Study. *Reprod Toxicol.* **51**: 7–13.
- 16 Grafnetterová AP, Vrbík K, Malý M, Pavloušková J, Krsková A, Drgáčová A, et al. (2015). Levels of Metabolites of Phthalates, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Bisphenol A in Urine of Czech Students (Pilot Study). [Article in Czech]. *Hygiena.* **60**(3): 97–101.
- 17 Greally JM, Jacobs MN (2013). *In vitro* and *In vivo* Testing Methods of Epigenomic Endpoints for Evaluating Endocrine Disruptors. *ALTEX.* **30**(4): 445–71.
- 18 Hampl R, Kubátová J, Heráček J, Sobotka V, Stárka L (2013). Hormones and endocrine disruptors in human seminal plasma. *Endocr Regul.* **47**: 149–158.
- 19 Hampl R, Kubátová J, Stárka L (2016). Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **155**: 217–23.
- 20 Hormann AM, Vom Saal FS, Nagel SC, Stahlhut RW, Moyer CL, Ellersieck MR, (2014). Holding thermal receipt paper and eating food after using hand sanitizer results in high serum bioactive and urine total levels of bisphenol A (BPA). *PLoS One.* **9**(10): e110509.
- 21 Isidori M, Lavorgna M, Palumbo M, Piccioli V, Parrella A (2007). Influence of alkylphenols and trace elements in toxic, genotoxic, and endocrine disruption activity of wastewater treatment plants. *Environ Toxicol Chem.* **26**(8): 1686–94.
- 22 Ji K, Hong S, Kho Y, Choi K (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environ Sci Technol.* **47**: 8793–8800.
- 23 Kundakovic M, Gudsruk K, Franks B, Madrid J, Miller RL, Perera FP, et al. Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**(24): 9956–61.
- 24 Liao C, Liu F, Kannan K (2012a). Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environ Sci Technol.* **46**: 6515–6522.
- 25 Liao C, Kannan K (2013). Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *J Agric Food Chem.* **61**: 4655–4662.
- 26 Liao C, Kannan K (2014). A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States. *Arch Environ Contam Toxicol.* **67**: 50–59.
- 27 Liao C, Liu F, Alomirah H, Loi VD, Mohd MA, Moon HB et al. (2012b). Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environ Sci Technol.* **46**: 6860–6866.
- 28 Luccio-Camelo DC, Prins GS (2011). Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* **127**: 74–82.
- 29 Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M (2013). The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nature Reviews. Endocrinology.* **9**(12): 699–712.
- 30 Meeker JD (2012). Exposure to Environmental Endocrine Disruptors and Child Development. *Arch Pediatr Adolesc Med.* **166**(10): 952–958.
- 31 Molina-Molina JM, Amaya E, Grimaldi M, Sáenz JM, Real M, Fernández MF, et al. (2013). *In vitro* study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **272**: 127–136.
- 32 Mráz M, Svačina S, Kotlíková E, Piecha R, Vrbík K, Pavloušková J, et al. (2016). Potential sources of phthalates and bisphenol A and their significance in the development of metabolic diseases. [Article in Czech]. *Cas Lek Cesk.* **155**(3): 11–5.
- 33 Müllerová D, Kopecký J (2007). White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* **56**: 375–381.
- 34 Munn S, van der Linden S, Losti A (2015). Methodology for evidence screening of chemicals developed in the context of an impact assessment on criteria to identify endocrine disruptors. Joint Research Centre, the European Commission's in-house science service; Systems Toxicology Institute for Health & Consumer Protection. Brussels, 6th November 2015, 81p.
- 35 Nikaido Y, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A (2005). Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 mice. *In Vivo.* **19**: 487–494.
- 36 OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. No. 150, ENV/JM/MONO(2012)22. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris, 524p.
- 37 OECD (2008). Detailed Review Paper on the Use of Metabolising Systems for *In vitro* Testing of Endocrine Disruptors. No. 97, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris, 95p.
- 38 OECD (2012b). Detailed Review Paper on the State of the Science on Novel *In vitro* and *In vivo* Screening and Testing Methods and Endpoints for Evaluating Endocrine Disruptors, No. 178. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris, 213p.
- 39 OECD (2007). Guidance document on the validation of (quantitative) structure-activity relationships (Q)SAR models. No. 69, ENV/JM/MONO(2007)2. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris, 154p.
- 40 Orton F, Ermier S, Kugathas S, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A (2014). Mixture effects at very low doses with combinations of anti-androgenic pesticides, antioxidants, industrial pollutant and chemicals used in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol.* **278**(3): 201–8.
- 41 Paris F, Balaguer P, Terouanne B, Servant N, Lacoste C, Cravedi JP, Nicolas JC, Sultan C (2002). Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* **193**: 43–49.
- 42 Piecha R, Svačina S, Malý M, Vrbík K, Lacinová Z, Haluzík M, et al. (2016). Urine levels of phthalate metabolites and bisphenol A in relation to main metabolic syndrome components: dyslipidaemia, hypertension and type 2 diabetes (pilot study). *Cent Eur J Public Health*; doi: 10.21101/cejph.a4704 (in press).
- 43 Prasanth GK, Divya LM, Sadasivan C (2010). Bisphenol-A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an in silico study. *J. Appl. Toxicol.* **30**: 769–774.
- 44 Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A (2002). Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone activity. *Environ Health Perspect.* **110**(9): 917–921.
- 45 Rancière F, Lyons JG, Loh VHY, Botton J, Galloway T, Wang T, et al. (2015). Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence. *Environ Health.* **14**: 46.
- 46 Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walser-Kuntz DR, vom Saal FS (2007). *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol.* **24**: 199–224.
- 47 Rider CV, Furr JR, Wilson VS, Gray LE Jr (2010). Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. *Int J Androl.* **33**(2): 443–62.
- 48 Rider, CV, Wilson, VS, Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Furr JR, Lambright ChR et al. (2009). Cumulative Effects of In Utero Administration of Mixtures of "Antiandrogens" on Male Rat Reproductive Development. *Toxicol Pathol.* **37**: 100–113.

- 49 Roelofs MJE, van den Berg M, Bovee TFH, Piersma AH, Van Duursen MBM (2015). Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. *Toxicology*. **329**: 10–20.
- 50 Rogers JM, Denison MS (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals. *In Vitro Mol Toxicol*. **13**(1): 67–82.
- 51 Rochester JR, Bolden AL (2015). Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect*. **123**(7): 643–650.
- 52 Rossi EM, Marques VB, Nunes Dde O, Carneiro MT, Podratz PL, Merlo E, et al (2016). Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats. *Toxicol Lett*. **240**(1): 196–213.
- 53 Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. **127**(2011): 27–34.
- 54 Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A (2002). Something from "nothing" – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol*. **36**: 1751–1756.
- 55 Schlumpf M, Durrer S, Faass O, Ehnes C, Fuetsch M, Gaille C, et al (2008). Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review. *Int J Androl*. **31**(2): 144–51.
- 56 Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ (2011). Endocrine Disrupting Chemicals and Disease Susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **127**(3–5): 204–215.
- 57 Shannon M, Rehfeld A, Frizzell C, Livingstone C, McGonagle C, Skakkebaek NE, Wielogórska E, Connolly L (2016). *In vitro* bioassay investigations of the endocrine disrupting potential of steviol glycosides and their metabolite steviol, components of the natural sweetener Stevia. *Mol Cell Endocrinol*. **427**: 65–72.
- 58 Stroheker T, Chagnon MC, Pinnert MF, Berges R, Canivenc-Lavier MC (2003). Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol*. **17**: 421–432.
- 59 Teeguarden JG, Twaddle NC, Churchwell MI, Yang X, Fisher JW, Seryak LM, et al. (2015). 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicol Appl Pharmacol*. **288**(2): 131–142.
- 60 Thayer KA, Taylor KW, Garantzotis S, Schurman SH, Kissling GE, Hunt D, et al. (2015). Bisphenol A, Bisphenol S, and 4-Hydroxyphenyl 4-Isopropoxyphenylsulfone (BPSiP) in Urine and Blood of Cashiers. *Environ Health Perspect*. **124**(4): 437–44.
- 61 Trasande L, Attina TM, Blustein J (2012). Association Between Urinary Bisphenol A Concentration and Obesity Prevalence in Children and Adolescents. *JAMA*. **308**(11): 1113–1121.
- 62 Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Kavvalakis MP, Bampas M, Kokkinakis EN, Xenos K et al. (2015). Biomonitoring of bisphenol A in hair of Greek population. *Chemosphere*. **118**: 336–41.
- 63 Vandenberg LN, Ehrlich S, Belcher SM, Ben-Jonathan N, Dolinay DC, Hugo ER, et al (2013). Low dose effects of bisphenol A. *Endocrine Disruptors*. **1**(1): e26490.
- 64 Vandenberg LN (2014). Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol A as a case study. *Dose Response*. **12**: 259–276.
- 65 Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJ, Schoenfelder G (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*. **118**: 1055–1070.
- 66 Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, et al. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*. **33**: 378–455.
- 67 Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochimica Medica* **24**(3): 329–42.
- 68 Wang J, Zhu X, Zhang X, Zhao Z, Liu H, George R, et al. (2011). Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO₂ nanoparticles. *Chemosphere*. **83**(4): 461–7.
- 69 Wirbisky SE, Weber GJ, Sepúlveda MS, Lin TL, Jannasch AS, Freeman JL (2016). An embryonic atrazine exposure results in reproductive dysfunction in adult zebrafish and morphological alterations in their offspring. *Scientific Reports*. **6**: 21337.
- 70 Wolff MS, Teitelbaum SL, McGovern K, Pinney SM, Windham GC, Galvez M et al. (2015). Environmental phenols and pubertal development in girls. *Environ Int*. **84**: 174–180.
- 71 WHO (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. World Health Organization, the International Labour Organisation, and the United Nations Environment Programme. Geneva, Switzerland. WHO/PCS/EDC/02.2.: 180p.
- 72 Yang CZ, Yaniger SI, Jordan VC, Klein DJ, Bittner GD (2011). Most Plastic Products Release Estrogenic Chemicals: A Potential Health Problem that Can Be Solved. *Environ Health Perspect*. **119**(7): 989–996.
- 73 Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*. **82**(2011): 424–430.
- 74 Zhao B, Bohonowych JES, Timme-Laragy A, Jung D, Affatato AA, et al. (2013). Common Commercial and Consumer Products Contain Activators of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. *PLoS ONE*. **8**(2): e56860.
- 75 Zoeller RT, Bansal R, Parris C (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist *in vitro*, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology*. **146**: 607–612.

Selected bisphenols and phthalates screened for estrogen and androgen disruption by *in silico* and *in vitro* methods

Markéta DVOŘÁKOVÁ^{1,2}, Kristina KEJLOVÁ², Marian RUCKI², Dagmar JÍROVÁ^{1,2}

¹ Charles University in Prague, Third Faculty of Medicine, Ruská 87, Prague, Czech Republic

² National Institute of Public Health, Centre of Toxicology and Health Safety, Šrobárova 48, Prague, Czech Republic

Correspondence to: Markéta Dvořáková, M.Sc.
National Institute of Public Health, Centre of Toxicology and Health Safety,
Šrobárova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic.
TEL: +420 267082327; FAX +420 267082386; E-MAIL: marketa.dvorakova@szu.cz

Submitted: 2018-06-20 Accepted: 2018-09-17 Published online: 2018-11-18

Key words: endocrine disruption; bisphenol; phthalates; chemicals; *in vitro*

Neuroendocrinol Lett 2018; 39(5):409–416 PMID: 30664347 NEL390518A09 ©2018 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

Abstract

OBJECTIVES: The aim of this study was to detect endocrine disruption potential of selected bisphenols and phthalates, compare *in silico* prediction with results from two *in vitro* methods and bring up-to-date information on development of EU legislation, available *in vitro* methods and biomechanisms involved in endocrine disruption.

MATERIAL AND METHODS: *In silico* approach based on the OECD QSAR Toolbox was used for prediction of estrogen receptor α binding. OECD TG 455 assay and a yeast-based YES/YAS assay was used to determine the interactions with human estrogen (ER α) and androgen receptors.

RESULTS: *In silico* results predicted the screened phthalates as non binders and bisphenols as very strong binders of the ER α . *In vitro* results differed from *in silico* prediction in several cases but exhibited concordance mainly for strong binders of ER α . Most of the substances exhibited parallel activity (agonist-antagonist) on both estrogen and androgen receptors. Agonistic studies showed the effective concentration of 10% activity (EC₁₀) from 5.0E-07 for strong agonists (e.g. BPC, BPTMC). Cytotoxicity was observed after 48 h exposure of *S. cerevisiae* to BPFL, BPG, BPM, BPTMC in concentrations starting at 3.6E-05 mol/l.

CONCLUSION: Our results suggest multiple parallel interactions of tested compounds and emphasize the importance of determination of an appropriate battery of *in vitro* methods that will include more receptors and will be appropriate to target specific molecular mechanisms involved in endocrine disruption. Results in agonistic studies indicate agonistic potential and are supported by results of antagonistic studies with consideration of possible multiple interactions.

Abbreviations:

ADME - Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion
AR - androgen receptor
BBP - benzyl butyl phthalate
BPBP - bisphenol BP
BPC - bisphenol C
BPFL - bisphenol FL
BPG - bisphenol G

BPM - bisphenol M
BPP - bisphenol P
BPTMC - bisphenol TMC
CF - Conceptual Framework
DEP - diethyl phthalate
DEHP - bis(2-ethylhexyl) phthalate
DBP - dibutyl phthalate
DHT - 5 α -dihydrotestosterone

To cite this article: **Neuroendocrinol Lett** 2018; 39(5):409–416

DIBP	- diisobutyl phthalate
DINP	- diisononyl phthalate
DIDP	- diisodecyl phthalate
E2	- 17 β -estradiol
EDs	- endocrine disruptors
ER	- estrogen receptor
GD	- Guideline Document
MW	- molecular weight
EFSA	- European Food Safety Authority
ECHA	- European Chemicals Agency
JRC	- the Joint Research Centre
OD	- optical density
OECD	- Organization for Economic Cooperation and Development
OPPTS	- Office of Prevention, Pesticides & Toxic Substances
QSAR	- Quantitative Structure-Activity Relationship
TG	- Test Guideline
US EPA	- United States Environmental Protection Agency

INTRODUCTION

Endocrine disruptors (EDs) are exogenous ligands capable to bind to cellular receptors or serum transport proteins, potentially contributing to signaling pathways modulation, endocrine system disturbances and consequent developmental, reproductive and system disorders (Latchney *et al.* 2018; Frye *et al.* 2012; Marty *et al.* 2010; Skah *et al.* 2017). Sources of exposure come from industry or agriculture, including consumer products, e.g. food packaging materials, thermopaper, plastics, paintings, household products or cosmetics. Interaction of ligands with receptors is a molecular initiation event that leads to complex effects. The physiological receptor mechanism may be affected either by direct receptor binding, resulting in activation (agonistic activity) or inhibition (antagonistic activity), or consequent modulation of associated signaling pathways' regulation. Human receptors may share ligands including endocrine disruptors with varying selectivity, affinity and efficacy, of which certain may be persistent, leading to bioaccumulation, while others may be rapidly metabolised and act for a limited time (Balaguer *et al.* 2017; Farman & Rafestin-Oblin 2001; Hothersall *et al.* 2016; Wang *et al.* 2016; Wagner *et al.* 2001). Certain endogenous ligands are hydrophilic molecules unable to pass through the plasma membrane such as glycoproteins (e.g., thyroid stimulating hormone, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone), catecholamines (e.g., dopamine, adrenaline) and peptide hormones (e.g., prolactin, somatotropin, adrenocorticotropic, antidiuretic, parathyroid hormone, calcitonin, oxytocin, insulin, glucagon) with target transmembrane receptors. Receptors for lipophilic endogenous ligands able to enter the cell via the plasma membrane such as steroid (e.g., estrogen, testosterone, progesterone), thyroid (triiodothyronine, thyroxine) and corticosteroid (cortisol, corticosterone, cortisone, aldosterone) hormones are located in the cytoplasm, functioning as transcription factors (Schweizer *et al.* 2014; Yang *et*

al. 2015). The organism may be exposed to a mixture of chemically diverse potential ligands with variable affinity, efficacy and resistance time, e.g., bisphenols, phthalates, parabens, alkylphenols, polyaromatic hydrocarbons, polychlorinated and polybrominated biphenyls, perfluoralkyls, pesticides, organotins, synthetic hormones etc., as well as natural compounds such as mycotoxins or phytoestrogens (Diamanti-Kandarakis *et al.* 2009; Sifakis *et al.*, 2017). Physiological effects *in vivo* may be influenced by various factors, such as developmental stage, bioavailability, distribution, metabolic transformation, tissue disposition and elimination (Bruning *et al.* 2016; Liu *et al.* 2015; Kato *et al.* 2006). Human exposure may be influenced also by individual physiological, medical, social and ecological factors (e.g., health condition, medication, health disorders, biorhythm, aging, individual variability of metabolism, genetic mutations and polymorphism, nutrition, environment, smoking, stress), that may modulate number of receptors, kinetics, bioaccumulation, and cause synergic and additive interactions (Lovallo *et al.* 2015, Brody *et al.* 2014, Pivovarova *et al.* 2012, Lambert *et al.* 2004, Folmer 2018; Dahl & Akerud 2013). With regard to the above mentioned biomechanisms and factors, it is difficult to attribute identified endocrine disruption *in vivo* to a distinct endocrine disruptor, as the associations of ED's levels with selected biomarkers of action (e.g. hormone, enzyme or protein levels) may not directly confirm causal relationships in case of such multifactorial exposure (Vineis & Kriebel 2006). Development and use of *in silico* screening tools and *in vitro* methods is therefore effective for first-level primary screening and should be used more intensively for hazard identification. Numerous biological *in vitro* methods based on transfected cell lines or yeast have been recently developed. OECD Test Guidelines (TGs) and standardized test methods are listed in the OECD Guidance document No. 150 (OECD, 2012) for evaluating chemicals for endocrine disruption. The OECD GD 150 was updated (Update v3) in December 2017 and describes new assays of all levels (Level 1–5) included in the updated OECD Conceptual Framework (CF) for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. Read across, chemical categories, QSAR and other *in silico* and ADME model predictions may be used at Level 1. TGs provide data about physical and chemical properties, e.g. MW, reactivity, volatility, biodegradability. At Level 2, TGs provide *in vitro* data about selected endocrine mechanisms and pathways, covering mammalian and non mammalian test systems. For Level 3–5 only *in vivo* assays are available, using various models (insects, crustaceans, gastropods, amphibians, fish, rodents, avians) (OECD 2012).

Test Guidelines for *in vitro* determination of various endpoints of endocrine disruption listed in OECD GD 150, available for Level 2 of OECD CF, comprise e.g. the following endpoints:

- Estrogen or androgen receptor binding affinity (OECD TG 493), (US EPA TG OPPTS 890.1150)
- Estrogen receptor transactivation (OECD TG 455)
- Androgen receptor transactivation (OECD TG 458)
- Steroidogenesis *in vitro* (OECD TG 456)
- Aromatase assay (US EPA TG OPPTS 890.1200)
- Thyroid disruption assays (e.g. thyroperoxidase inhibition, transthyretin binding)
- Retinoid receptor transactivation assays
- Other hormone receptors assays as appropriate
- High-throughput screens (OECD GD No. 211 Describing Non-Guideline In Vitro Test Methods)

In our continuous pilot study, selected bisphenols and phthalates were tested using OECD QSAR Toolbox for *in silico* prediction of estrogenic potential. Two *in vitro* methods based on human cell line and yeast were used in order to determine the interactions of the tested chemicals with human estrogen and androgen receptors.

MATERIAL AND METHODS

Selected phthalates and bisphenols, i.e. Diethyl phthalate (DEP), Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), Benzyl butyl phthalate (BBP), Dibutyl phthalate (DBP), Diisobutyl phthalate (DIBP), Diisononyl phthalate (DINP), Diisodecyl phthalate (DIDP), Bisphenol BP (BPP), Bisphenol C (BPC), Bisphenol FL (BPFL), Bisphenol G (BPG), Bisphenol M (BPM), Bisphenol P (BPP), Bisphenol TMC (BPTMC) (Sigma Aldrich) were tested in a continuous pilot study for endocrine activity, compared to relevant analytical standards (Methoxychlor, 17 β -estradiol – E2, 4-Hydroxytamoxifen, 5 α -dihydrotestosterone – DHT, Flutamide). Chemical structures of the tested compounds are indicated in Table 1.

OECD QSAR toolbox

OECD QSAR Toolbox (Toolbox 3.3.2 Release Notes) was used for prediction of potential ligands and their binding affinity to the estrogen receptor α based on their chemical structure, molecular weight and partition coefficient octanol-water. For ER binding endpoint, OECD QSAR Toolbox contains categories of ER binders and is relevant for reproductive toxicity endpoints in fish and mammals. The ER-binding profiler classifies chemicals as non binders or binders depending on molecular weight (MW) and structural characteristics of the chemicals: very strong binders (chemicals with MW between 200 and 500 Da and two rings with a hydroxyl group connected to each of them), strong binders (chemicals with at least one 5- or 6-members carbon ring with an unhindered hydroxyl or amino group and MW between 200 and 500 Da), moderate binders (chemicals with at least one 5- or 6-members carbon ring with an unhindered hydroxyl or amino group and MW between 170 and 200 Da), weak binders (chemicals with at least one 5-or

6-members carbon ring with an unhindered hydroxyl or amino group and MW less than 170 Da). If the chemical does not meet the structural and parametric requirements, it is classified as non binder, e.g. non binder with impaired hydroxyl or amino group, non binder with MW more than 500 Da, non binders without hydroxyl or amino group; non-cyclic non binder.

Stably transfected transactivation *in vitro* assay to detect estrogen receptor agonists (OECD TG 455)

A continuous human cell line VM7Luc4E2, graciously provided by Prof. Michael Denison, UC Davis, California, USA, for research purposes during the initial part of the study, was used for confirmation of OECD QSAR Toolbox prediction. The assay is based on binding of a tested substance to ER α . The culture and assay was performed according to recommended procedure, with minor modifications (Rogers & Denison 2000). In brief, cells were cultured in MEM α medium (Gibco), containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Five days prior analysis, cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium, estrogen stripped and phenol red free (Sigma Aldrich), with 8% charcoal stripped fetal bovine serum and 1.9% supplement of L-glutamine with daily media change. Cells were plated in 96-well plates (100 μ l per well) at a concentration of 500,000 cells/ml and incubated for 24h (37°C, 5% CO₂). The next day the plated cells were treated with tested compounds in triplicates in selected concentrations for 24h (37°C, 5% CO₂). Luciferase Assay System (Promega) in combination with Glomax Multi Plus Injector Luminometer (Promega) was used for luminescence measurement of the ER α activation by the test substance.

Yeast based reporter gene assay (Xenoscreen YES/YAS)

A commercially available yeast-based microplate assay (Xenoscreen YES/YAS, Xenometrix®, Switzerland) designed for detection of compounds with estrogenic and androgenic agonistic/antagonistic activities of chemicals, water samples and biological fluids, based on recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains with human estrogen (hER α) and androgen (hAR) receptors was used as a comparative test to OECD TG 455 method and for determination of interactions of the tested compounds with human androgen receptor. The assay was performed according to the provided standard operating procedure, using the supplied standardized material and chemicals. Briefly, the pre-cultured cell suspension was exposed to the tested compounds for 48 hours on orbital shaker. The OD of the red product resulting from conversion of the yellow substrate after secretion of β -galactosidase was measured on Biotec Eon™ High Performance Microplate Spectrophotometer at 570 nm. The OD₅₇₀ of the end product in comparison with controls provides direct correlation with the endocrine activity of the tested substances.

RESULTS

Structure and MW of the tested compounds are listed in Table 1. *In silico* and *in vitro* results are presented in Table 2. Using the OECD QSAR Toolbox, a compound was categorized as a strong binder (+++) according to MW (between 200 and 500 Da), chemical structure

(two rings with a hydroxyl group connected to each of them) and partition coefficient octanol-water. If the compound did not meet structural and parametric requirements, it was predicted as non binder (N) (chemicals with impaired hydroxyl or amino group or without hydroxyl or amino group). *In silico* results predicted all the screened phthalates as non binders and

Tab. 1. Chemical structures of tested phthalates and bisphenols.

Compound	CAS No.	M.W.	Chemical formula	Structural formula
Diethyl phthalate (DEP)	84-66-2	222.24	C ₆ H ₄ -1,2-(CO ₂ C ₂ H ₅) ₂	
Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	117-81-7	390.56	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	
Benzyl butyl phthalate (BBP)	85-68-7	312.36	2-[CH ₃ (CH ₂) ₃ O ₂ C] C ₆ H ₄ CO ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	
Dibutyl phthalate (DBP)	84-74-2	278.34	C ₆ H ₄ -1,2-[CO ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃] ₂	
Diisobutyl phthalate (DIBP)	84-69-5	278.34	C ₆ H ₄ -1,2-[CO ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂] ₂	
Diisononyl phthalate (DINP)	28553-12-0	418.61	C ₆ H ₄ (CO ₂ C ₉ H ₁₉) ₂	
Diisodecyl phthalate (DIDP)	26761-40-0	446.66	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	
Bisphenol BP (BPP)	1844-01-5	352.43	C ₂₅ H ₂₀ O ₂	
Bisphenol C (BPC)	79-97-0	256.34	(CH ₃) ₂ C[C ₆ H ₃ (CH ₃)OH] ₂	
Bisphenol FL (BPFL)	3236-71-3	350.41	C ₂₅ H ₁₈ O ₂	
Bisphenol G (BPG)	127-54-8	312.45	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	
Bisphenol M (BPM)	13595-25-0	346.46	C ₆ H ₄ [C(CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ OH] ₂	
Bisphenol P (BPP)	2167-51-3	346.46	C ₆ H ₄ [C(CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ OH] ₂	
Bisphenol TMC (BPTMC)	129188-99-4	310.43	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	

all the screened bisphenols as very strong binders to ER α , as indicated in Table 2. The results of agonistic *in vitro* assays (indicated in Table 2) were categorized as follows: the result categorized as +++ (strong) indicates that the substance (BPC, BPTMC, BBP) showed a strong concentration-dependent response with a concentration response curve consisting of a baseline, followed by a slope concluding in a plateau or peak, while the difference between the baseline and peak of the highest non-cytotoxic concentration was at least 70% of the maximal value for the positive control (17 β -estradiol in agonistic assay with the ER α receptor, 5 α -dihydrotestosterone in agonistic assay with the AR receptor). The result categorized as ++ (moderate) indicates that the substance (BBP, BPG, BPM, DBP) showed a concentration-response curve consisting of a baseline, followed by a slope concluding in a plateau or peak, while the difference between the baseline and peak of the highest non-cytotoxic concentration was at least 40% of the maximal value for the positive control. The result categorized as + (weak) indicates that the substance (DBP, BPG, BPFL) showed a weak response, consisting of a baseline, followed by a slope or peak, and the difference between the baseline and peak of the highest non-cytotoxic concentration was at least 20% of the maximal value for the positive control. The result categorized as N (negative) indicates that the substance did not show a response consisting of a baseline, a slope or peak in non-cytotoxic concentrations (DINP, DIDP, DEP, DEHP, BPBP, BPFL) or showed a weaker response than + (weak). The results of antagonistic *in vitro* assays (indicated in Table 2) were categorized as follows: the result categorized as +++ (strong) indicates that the

substance (BPP, BPC, BPM) showed a strong concentration-dependent response with a declining curve consisting of a baseline, followed by a decline, while the lowest value in non-cytotoxic concentration was not higher than 130% of the lowest value for the positive control (4-hydroxytamoxifen in the antagonistic assay with the ER α receptor, Flutamide in the antagonistic assay with the AR receptor). The result categorized as ++ (moderate) indicates that the substance (BPBP, BPG, BPP, BPTMC, DBP) showed a concentration-dependent response with a declining curve consisting of a baseline, followed by a decline, while the lowest value in non-cytotoxic concentration was not higher than 200% of the lowest value for the positive control. The result categorized as + (weak) indicates that the substance (BBP, DBP, DEHP, DIBP, BPBP, BPFL, BPG, BPM) showed a weak concentration-dependent response with a declining curve consisting of a baseline, followed by a decline, while the lowest value of non-cytotoxic concentration was not higher than 300% of the lowest value for the positive control. The result categorized as N (negative) indicates that the substance (DIDP, DINP, BPFL, BPC) did not show a concentration-dependent response with a declining curve consisting of a baseline, followed by a decline, and the lowest value of non-cytotoxic concentration was higher than 300% of the lowest value for the positive control. Cytotoxicity was observed after 48 h exposure of *S. cerevisiae* to BPFL, BPG, BPM, BPTMC in concentrations starting at 3.6×10^{-5} mol/l, as indicated in Table 2. Effective concentration EC₁₀ (the concentration that causes the measured effect in 10% of cells) of selected bisphenols achieved values of 5.0E-07 for strong agonists (e.g. BPC), as indicated in Table 3.

Tab. 2. Endocrine activity of tested compounds.

Substance	ER binding (QSAR)	ER agonist (OECD 455)	ER agonist (YES)	ER antagonist (YES)	AR agonist (YAS)	AR antagonist (YAS)
Diethyl phthalate (DEP)	N	N	N	N	N	N
Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	N	N	N	N	N	+
Benzyl butyl phthalate (BBP)	N	+++	++	N	N	+
Dibutyl phthalate (DBP)	N	++	N	++	N	+
Diisobutyl phthalate (DIBP)	N	++	N	N	N	+
Diisononyl phthalate (DINP)	N	N	N	N	N	N
Diisodecyl phthalate (DIDP)	N	N	N	N	N	N
Bisphenol BP (BPBP)	+++	N	N	+	N	++
Bisphenol C (BPC)	+++	+++	+++	N	N	+++
Bisphenol FL (BPFL)*	+++	N	+	+	++	N
Bisphenol G (BPG)*	+++	+	++	+	N	++
Bisphenol M (BPM)*	+++	++	+	+	N	+++
Bisphenol P (BPP)	+++	++	N	+++	N	++
Bisphenol TMC (BPTMC)*	+++	+++	+++	N	N	++

*In the highest possible tested concentration: 10^{-5} mol/l; +++ - strong binder; ++ - moderate binder; + - weak binder; N - non binder

Tab. 3. Effective concentration (EC₁₀) of selected bisphenols in YES/YAS agonist assays.

YES Agonist Assay	EC ₁₀
BPC	5.0E-07
BPTMC	4.0E-06
BPFL	8.8E-06
BPG	1.9E-05
E2 (Positive control)	5.3E-11
YAS Agonist Assay	EC ₁₀
BPFL	4.9E-06
DHT (Positive control)	5.1E-10

DISCUSSION

Our *in vitro* results differed slightly from *in silico* prediction and exhibited good concordance regarding the estrogenic activity, mainly for strong binders. OECD QSAR Toolbox prediction correlated with *in vitro* results in negative prediction for DEP, DEHP, DIDP, DINP, and differed in case of BBP, DBP and DIBP that showed estrogenic potential *in vitro*. QSAR prediction of categorization differed from *in vitro* results in case of BPBP, BPFL, BPG, BPM, BPP, predicted as very strong binders, while *in vitro* estrogenic potential was detected as moderate or weak. Our results show that *in silico* prediction should be confirmed by *in vitro* results in various biological systems, however, the OECD QSAR Toolbox turns out to be a promising starting point for prediction of chemical groups with possible endocrine potential. For the activity of compounds against the androgen receptor (AR) the YAS method was used and the correlation of results with an appropriate *in silico* tool would be interesting study in the future. Unfortunately, there are still few *in silico* models with AR binding endpoint internationally validated and accepted. In antagonist assays targeting the mechanism of inhibition of agonist binding to the receptor, the binding of the agonist and antagonist is generally presumed to be mutually exclusive. However, several types of agonism and antagonism have been described recently, providing information about possible multiple activities of substances and their interactions with the receptors. For example, agonist-antagonists may show both agonist and antagonist properties, which may be the case of most of the tested substances. Specific molecular reactions may occur, e.g. the substance may bind to non-specific recognition site on the receptor (allosteric agonist), dissociate (reversible antagonist) or form stable chemical bonds (irreversible antagonists), etc. In competitive antagonism, binding of an antagonist should prevent binding of the agonist, but in case of noncompetitive antagonism, agonist and antagonist can be bound simultaneously, whereas the antagonist reduces the action of the

agonist. In case of reversible competitive antagonism, agonist and antagonist form short-lasting bonds with the receptor, reaching a steady state. *In vivo*, a substance that acts as a (partial) agonist in one tissue may act as a (full) agonist in another. Substances may be also nonspecific binders and bind to molecular sites e.g. on serum proteins (in blood *in vivo* or in media or reagents used *in vitro*), preventing the transport of endogenous hormones. Biochemical mechanisms should be considered when evaluating the results *in vitro* (and even more *in vivo*), taking into account the precautionary principle (Salahudeen & Nishtala 2017; Allegretti *et al.* 2016; Bookout *et al.* 2006; Yang *et al.* 2006, Lambert 2004). Our results confirm the above mentioned multiple interactions of the substances with the receptors and suggest agonistic studies to be more reliable when supported by results from antagonistic studies, in order to detect the overall parallel interactions of the substances to the estrogen and androgen receptors. Both agonistic and antagonistic studies should support the overall evaluation of the substance as a binder or non-binder, whereas variability of the results in various biological systems may be observed beside the above mentioned biochemical mechanisms, e.g. due to inhibition of cell wall transport to the yeast cell or cytotoxicity in higher concentrations. It is advisable to monitor viability, use multiple concentrations of positive controls and samples and final non-cytotoxic concentration of solvents (e.g. 1% DMSO), all of which was carefully monitored in our study. The complexity in biological mechanisms of endocrine disruption emphasizes the importance of further development of an appropriate battery of tests that will include more receptors (such as thyroid, retinoid, aryl hydrocarbon, peroxisome proliferator-activated receptor, liver X, vitamin D, pregnane X, growth hormone receptor, etc.), enabling the detection of more specific endocrine activities, involved in e.g. reproduction and development, steroidogenesis, metabolism, energy homeostasis, central nervous system regulation, etc. (Bookout *et al.* 2006, Yang *et al.* 2006). Numerous *in vitro* methods have already proved scientific relevance and have become publicly available (OECD 2012). *In vitro* methods based on yeast have already been included in ISO standards (ISO 2017) and are used for (eco)toxicological purposes. With regard to recent developments in the EU legislation, the onset of increasing pressure in the near future can be expected for testing chemicals mainly from the group of plant protection products.

From 10 November 2018 (EC 2018b), a substance shall be considered as having endocrine disrupting properties, if (1) it shows an adverse effect in non-target organisms, (2) it has an endocrine mode of action; (3) the adverse effect is a consequence of the endocrine mode of action. The identification of an active substance as having endocrine disrupting properties that may cause adverse effect in humans shall be based on: all available relevant scientific data (*in vivo* studies or

adequately validated alternative test systems predictive of adverse effects in humans or animals; as well as *in vivo*, *in vitro*, or, if applicable, *in silico* studies informing about endocrine modes of action (EC 2018a). Guidance on identifying endocrine disruptors was developed and published by scientific staff from European Chemical Agency (ECHA) and the European Food Safety Authority (EFSA), with the support of the Joint Research Centre (JRC) to ensure harmonised implementation of the endocrine disruptor criteria throughout the EU for the assessment of biocides and plant protection products. The Guideline advises applicants and assessors of the competent regulatory authorities on how to identify endocrine disruptors in accordance with the criteria. The criteria for biocides apply from 7 June 2018. (ECHA & EFSA, 2018; EC, 2018a).

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by ERDF/ESF project “International competitiveness of NIPH in research, development and education in alternative toxicological methods” (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000860).

REFERENCES

- Allegretti M, Cesta MC, Locati M. (2016). Allosteric Modulation of Chemoattractant Receptors. *Front Immunol.* **7**: 170.
- Balaguer P, Delfosse V, Grimaldi M, Bourguet W (2017). Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. *C R Biol.* **340**(9–10): 414–420.
- Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell.* **126**(4): 789–99.
- Brody AL, Mukhin AG, Mamoun MS, Luu T, Neary M, Liang L, Shieh J, Sugar CA, Rose JE, Mandelkern MA (2014). Brain Nicotinic Acetylcholine Receptor Availability and Response to Smoking Cessation Treatment. A Randomized Trial. *JAMA Psychiat.* **71**(7): 797–805.
- Bruning O, Rodenburg W, Wackers PF, van Oostrom C, Jonker MJ, Dekker RJ, Rauwerda H, Ensink WA, de Vries A, Breit TM (2016). Confounding Factors in the Transcriptome Analysis of an In-Vivo Exposure Experiment. *PLoS One.* **11**(1): e0145252.
- Dahl G, Akerud T. (2013). Pharmacokinetics and the drug–target residence time concept. *Drug Discov.* **18**(15–16): 697–707.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev.* **30**(4): 293–342.
- EC (2018a). Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018 amending Annex II to Regulation (EC) No 1107/2009 by setting out scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties. *Official Journal of the European Union*, L 101, Pages 33–36, Brussels, 2018.
- EC (2018b). Corrigendum to Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018 amending Annex II to Regulation (EC) No 1107/2009 by setting out scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties. *Official Journal of the European Union*, L 111/10, Page 10, Brussels, 2018.
- European Chemicals Agency (ECHA) and European Food Safety Authority (EFSA) and the Joint Research Centre (JRC) (2018). Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009 (Pre-publication version; June 2018), Question number: EFSA-Q-2016-00825 (Output number ON-5311).
- Farman N, Rafestin-Oblin ME (2001). Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol.* **280**(2): F181–92.
- Folmer RHA (2018). Drug target residence time: a misleading concept. *Drug Discov.* **23**(1): 12–16.
- Frye C, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessi-Fulgheri F, Fernández M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC (2012). Endocrine disruptors: A Review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behavior and neuroendocrine systems. *J Neuroendocrinol.* **24**(1): 144–159.
- Hothersall D, Brown AJ, Dale I, Rawlins P (2016). Can residence time offer a useful strategy to target agonist drugs for sustained GPCR responses? *Drug Discov.* **21**(1): 90–96.
- ISO (2017). Draft International Standard ISO/DIS 19040-1: 2017 (E). Water quality – Determination of the estrogenic potential of water and waste water – Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*), Switzerland, Pages 1–55.
- Kato I, Ren J, Heilbrun LK, Djuric Z (2006). Intra- and inter-individual variability in measurements of biomarkers for oxidative damage in vivo: Nutrition and Breast Health Study. *Biomarkers.* **11**(2): 143–52.
- Lambert DG (2004). Drugs and Receptors. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain.* **4**(6): 181–184.
- Latchney SE, Fields AM, Susiarjo M (2018). Linking inter-individual variability to endocrine disruptors: insights for epigenetic inheritance. *Mamm Genome.* **29**(1–2): 141–152.
- Liu H, Tang S, Zheng X, Zhu Y, Ma Z, Liu C, Hecker M, Saunders DM, Giesy JP, Zhang X, Yu H (2015). Bioaccumulation, biotransformation, and toxicity of BDE-47, 6-OH-BDE-47, and 6-MeO-BDE-47 in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol.* **49**(3): 1823–33.
- Lovallo WR, Enoch MA, Acheson A, Cohoon AJ, Sorocco KH, Hodgkinson CA, Vincent AS, Glahn DC, Goldman D (2015). Cortisol Stress Response in Men and Women Modulated Differentially by the Mu-Opioid Receptor Gene Polymorphism OPRM1 A118G. *Neuropsychopharmacology.* **40**: 2546–2554.
- Marty MS, Carney EW, Rowlands JC. 2011. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci.* **120**: S93–S108.
- OECD, 2012. Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, No. 150, Update v3, Series on Testing and Assessment, ENV/JM/MONO(2012)22, December 2017, Paris, Pages 1–988.
- Pivovarova O, Hornemann S, Weimer S, Lu Ye, Murahovschi V, Zhuk S, Seltmann AC, Malashicheva A, Kostareva A, Kruse M, Busjahn A, Rudovich N, Pfeiffer AFH (2015). Regulation of nutrition-associated receptors in blood monocytes of normal weight and obese humans. *Peptides.* **65**: 12–19.
- Rogers JM, Denison MS (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals. *In Vitro Mol Toxicol.* **13**(1): 67–82.
- Salahudeen MS, Nishtala PS (2017). An overview of pharmacodynamic modelling, ligand-binding approach and its application in clinical practice. *Saudi Pharm J.* **25**(2): 165–175.
- Schweizer U, Johannes J, Bayer D, Braun D (2014). Structure and Function of Thyroid Hormone Plasma Membrane Transporters. *Eur Thyroid J* **3**(3): 143–53
- Sifakis S, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA (2017). Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environ Toxicol Pharmacol.* **51**: 56–70.
- Skah S, Uchuya-Castillo J, Sirakov M & Plateroti M (2017). The thyroid hormone nuclear receptors and the Wnt/ β -catenin pathway: an intriguing liaison. *Dev Biol.* **422**(2): 71–82.

- 29 Vineis P, Kriebel D (2006). Causal models in epidemiology: past inheritance and genetic future. *Environ Health*. **21**(5): 21.
- 30 Wagner RL, Huber BR, Shiau AK, Kelly A, Cunha Lima ST, Scanlan TS, Apriletti JW, Baxter JD, West BL, Fletterick RJ (2001). Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol*. **15**(3): 398–410.
- 31 Wang FF, Yang W, Shi YH, Cheng XR, Le GW (2016). Structure-based approach for the study of thyroid hormone receptor binding affinity and subtype selectivity. *J Biomol Struct Dyn*. **34**(10): 2251–67.
- 32 Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ, Evans RM (2006). Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*. **126**(4): 801–10.
- 33 Yang NJ, Hinner MJ (2015). Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. *Methods Mol Biol*. **1266**: 29–53.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

Toxicity of food contact paper evaluated by combined biological and chemical methods



Kristina Kejlová^{a,*}, Markéta Dvořáková^{a,c}, Adam Vavrouš^{a,d}, Václav Ševčík^{a,d},
Helena Kandárová^b, Silvia Letašiová^b, Jitka Sosnovcová^a, Dagmar Jírová^a

^aNational Institute of Public Health, Šrobárova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic

^bMatTek In Vitro Life Science Laboratories, Mlynské Nivy 73, 82105 Bratislava, Slovak Republic

^cThird Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic

^dFaculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Hlavova 2030/8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Paper-based
Food contact material
Cytotoxicity
Reconstructed human intestine model
Endocrine disruption
Chemical analysis

ABSTRACT

The study was focused on assessment of potential health risks of paper-based food contact materials (FCMs) in a step-wise approach using three toxicological bioassays in vitro and chemical analyses of migrating contaminants. 3T3 NRU cytotoxicity test showed high sensitivity to detect basal toxicity of FCMs extracts and served as a first-line test for selection of samples for further testing. The reconstructed human intestine model EpiIntestinal showed more realistic tissue response than cell culture monolayer and higher resistance despite prolonged exposure to the selected 6 samples, i.e. negligible decrease of viability and intestinal penetration, nevertheless an increase of IL-8 after exposure to black printed sample extract. Yeast based assays identified weak agonistic/antagonistic activity to human androgen receptor of the black printed sample. In accordance with the biological effects, the targeted LC and GC analytical methods confirmed the presence of high amounts of phthalates, photoinitiators and PAHs that could justify the hazard of the black printed sample. Heavily printed uncoated FCMs are recognized not to be suitable for direct contact with food. The selected bioassays and chemical analyses might be useful tools to detect targeted biological effects of xenobiotics suspected to contribute to human exposure from food.

1. Introduction

Food contact materials (FCMs) used in food packaging are an important element in the worldwide effort to provide consumers with safe and nutritious food and can be made from a variety of materials including paper, plastics, rubber, glass, metals and alloys. Disposable paper-based materials such as boxes, bags, plates, containers and napkins have been used in food packaging for many years. Their greatest benefit in comparison to plastic materials is their lower impact on the environment. Moreover, paper recycling represents a significant advantage, as cellulosic fibers may be used repeatedly in the paper production. However, recycling of paper and paperboard products for food packaging materials represents an area of conflict: on the one hand, the EU Packaging Directive No. 94/62 (EC, 1994) with its amendments encourages recycling instead of incineration leading to sustainable use

of materials, while on the other hand, recycling might bring components into food contact in amounts which might be problematic (Biedermann and Grob, 2010). Due to nonexistent harmonized legislative requirements on recycled paper the input raw material for recycling may be produced from used papers such as newspapers, magazines and cartons, which are initially pulped with water, cleaned and deinked with surfactants. A number of chemicals, such as slimicides, bleaching agents, photoinitiators and inks are used during the paper production process, resulting in the content of a large number of substances present in the finished product (Ozaki et al., 2004; Karmaus et al., 2018). These include intentionally added substances (IAS), which generally have a technical effect and/or have a performance property, and non-intentionally added substances (NIAS), a term introduced for plastics in Commission Regulation (EU) No. 10/2011, i.e. chemicals resulting from reaction and degradation processes or the presence of

Abbreviations: FCM, food contact material; IAS, intentionally added substances; NIAS, non-intentionally added substances; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; OD, optical density; G, growth factor; GIT, gastrointestinal tract; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbons; ADI, acceptable daily intake; TDI, tolerable daily intake; DHT, 5 α – dihydrotestosterone; E2, 17 β – estradiol; IR, induction ratio; ER, estrogen receptor; AR, androgen receptor

* Corresponding author at: National Institute of Public Health, Šrobárova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic.

E-mail address: kristina.kejlova@szu.cz (K. Kejlová).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.04.001>

Received 30 November 2018; Received in revised form 27 March 2019; Accepted 1 April 2019

Available online 02 April 2019

0887-2333/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

impurities in the raw materials used for the packaging production (Nerín et al., 2013).

In the EU, paper-based food packaging materials have to comply with basic rules concerning safety, listed in Regulation (EC) No. 1935/2004 on materials and articles intended to come in contact with food (EC, 2004). Article 3 requires that food contact materials do not transfer their constituents to food in quantities which could endanger human health, bring about unacceptable changes in the composition of the food or a deterioration in organoleptic characteristics. During the last few years, several studies on the migration of chemicals from FCMs into foodstuff and food simulants have been published, demonstrating that the proportion of substances migrating to food is strongly dependent on the nature of the paper product, fat content of the food, chemical nature and volatility of the migrant, contact time and temperature (Triantafyllou et al., 2007; Sanches-Silva et al., 2009; Zülch and Piringer, 2010; Suciú et al., 2013). Well-known migrants from paper and board include mineral oils, ink photoinitiators, dialkyl phthalates, polyaromatic amines and *per*- and polyfluorinated substances (Biedermann and Grob, 2010; Fierens et al., 2012; Bradley et al., 2013). Van Bossuyt et al. (2016) have found, that more than 6000 unique compounds can be used in printed paper and board FCMs; many of them might migrate and become bioavailable but have not been evaluated yet. Moreover, 19 of them are present in ECHA lists with substances of concern (<https://echa.europa.eu/web/guest/candidate-list-table>, accessed 26.11.2018).

Discussions on how to evaluate the safety of FCM components is still ongoing. Recently, the European Food Safety Authority (EFSA) published a scientific opinion on developments in the risk assessment of chemicals in food related to the safety assessment of substances used in FCMs, in which assessment of NIAS is only briefly discussed. According to the EFSA report, the same approach for the toxicological assessment has to be used for NIAS as applied to the authorized substances in FCMs. However, by contrast to IAS in a FCM, often the presence, identity and amount of NIAS in a FCM are simply unknown or unpredictable (EFSA, 2016). As the requirements on food packaging have increased significantly over recent decades (e.g. Industry guideline for the Compliance of Paper & Board Materials and Articles for Food Contact, issued by The Confederation of European Paper Industries, 2012, or TÜV SÜD website <https://www.tuv-sud.com/home-com/resource-centre/publications/e-ssentials-newsletter/food-health-e-ssentials/e-ssentials-3-2015/regulations-for-food-packaging-products-and-materials>, accessed 26.11.2018), the need for robust analytical and toxicological methods for safety evaluation of food contact products becomes more urgent. It is known that some of the migrating substances are not always detected by analytical chemistry but result in low but measurable human exposures. Testing FCM extracts with bioassays mimics the biological response of cells and tissues to a combination of substances released from the finished materials. Recently, a number of bioassays applied to assess hazard of FCM components were described for toxicological endpoints able to be expressed at low levels, such as cytotoxicity, genotoxicity, immunotoxicity and endocrine disruption potential (Binderup et al., 2002; Goulaouic et al., 2008; Groh and Muncke, 2017; Hansen et al., 2015; Plé et al., 2015; Van Bossuyt et al., 2018). Several studies show that combining both chemical and toxicological analyses (an effect-directed strategy) presents a very promising tool for identifying not only IAS, but also new undesirable and not predicted NIAS which may represent a considerable part of the migrating substances and/or “cocktail effect” (Severin et al., 2017; Rosenmai et al., 2017).

The presented study was focused on a survey of paper-based FCMs in the Czech Republic and their assessment employing a developed effect-directed strategy using a battery of *in vitro* toxicological bioassays with state-of-the-art analytical chemistry. The aim was to better facilitate the identification of potential problematic paper and board FCMs and to focus specifically on improving the identification of potentially hazardous components and their possible impact on human health. The toxicological endpoints included cytotoxicity of 3T3 Balb/c

fibroblasts, intestinal penetration, toxicity and immunotoxicity using reconstructed human tissue Epilntestinal FT (MatTek Corp., USA), which mimics the human gastrointestinal tract, and endocrine disruption assessed by a yeast based microplate assay Xenoscreen YES/YAS (Xenometrix AG, CH), designed for evaluation of agonistic/antagonistic interactions with human estrogen and androgen receptors. More than 200 extracts of commercially available paper and paperboard samples were tested *in vitro* using the 3T3 Balb/c NRU cytotoxicity test in order to screen their basal toxicity. Samples with the highest cytotoxic response foreseen to release the highest amount of potentially harmful chemicals were subsequently subjected to a step-by-step procedure attempting to identify biologically active constituents.

2. Material and methods

2.1. Paper and paperboard samples

A total of 231 samples of paper and paperboard (samples with different pulp percentage of recycled matter provided by local producers, paper household and party products obtained on the market) were tested for cytotoxicity in this study. Samples with heavy printing were cut and tested separately for each colour. On the basis of cytotoxicity results, parts of 3 coloured napkins with high cytotoxicity were subjected to further toxicological and analytical testing: black and white paper napkin A with black ink print designated as A (black print) and without ink print A (no print), multicoloured paper napkin B with red and blue print designated as B (red print), B (blue print), and white part designated as B (no print), and unicoloured yellow napkin C designated as C (yellow print).

2.2. Sample extraction

For the cytotoxicity test, the paper samples were extracted in accordance with ISO EN 10993:12 (ISO, 2012) in the ratio of 0.1 g of the material per 1 ml of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) without serum in chemically inert closed containers by using aseptic techniques (extraction time: 24 h, extraction temperature: 37 °C). The extract (100%) was further diluted in DMEM without serum to 50% and 25%.

For application on tissue models and HPLC-TOF-MS analysis of the overall content of extractable compounds, the paper samples were extracted under identical conditions in the ratio of 0.1 g of the material per 1 ml of deionized water.

For the endocrine disruption screen test and the targeted analyses of paper samples, the samples (1 g) were extracted in 20 ml of acetonitrile-ultrapure water 1:1 (v/v) at laboratory temperature for 15 min in an ultrasound bath. By adding 4 g MgSO₄ and 1 g NaCl, phase separation was achieved. After centrifugation, the supernatant (acetonitrile layer, approx. 10 ml) was taken for subsequent chemical analyses. For the YES/YAS assay, 3 ml of the acetonitrile extract (100%) were evaporated under nitrogen flow and the residue was dissolved in 300 µl of DMSO (i.e. 10 × concentrated, 1000%). In the next step, a dilution plate with logarithmic dilutions was prepared in DMSO and 2 µl of the concentrated extract and its dilutions were transferred into the assay plates with final volume 200 µl of testing medium, resulting in concentrations 0.316% - 1% - 3.16% - 10% and ensuring identical non-cytotoxic concentration of DMSO (1%) in all the wells in the assay plates. The procedure of preparation of dilution and assay plates is described in detail in XenoScreen YES/YAS Instructions for Use (Xenometrix, 2017). The highest tested concentration (10%) represents 10-fold dilution of the original acetonitrile extract analyzed by HPLC and GC methods.

2.3. Toxicological tests

2.3.1. 3T3 NRU cytotoxicity test

The Neutral Red Cytotoxicity Assay was performed according to standard ISO EN 10993-5:2009 (ISO, 2009). Balb/c 3T3 fibroblasts

were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with newborn calf serum (10%), subcultured in 96-well plates and exposed to the tested extracts (100%, 50% and 25%) for 24 h. The Neutral Red uptake (i.e. cell viability) was determined by fluorescence-luminescence reader FLX800TBI (BioTek). The viability of cell cultures treated with the experimental samples was expressed as percentage of the viability of the baseline cell culture control (treated with culture medium without serum). The cytotoxicity of the extracts was classified as follows: viability 70–100% no cytotoxicity, 50–70% mild cytotoxicity, 30–50% moderate cytotoxicity, 0–30% severe cytotoxicity.

2.3.2. Tissue model EpiIntestinal (SMI-100-FT™)

The newly developed, highly differentiated, metabolically active reconstructed tissue model EpiIntestinal (SMI-100-FT™) (full-thickness) was obtained from MatTek Corp., USA. The human cell-based 3D model incorporates enterocytes, paneth cells, M cells, tuft cells and intestinal stem cells into a highly differentiated, polarized epithelium. The EpiIntestinal FT tissue includes an underlying lamina propria containing normal human intestinal fibroblasts, functional tight junctions and brush borders at the apical tissue surface (www.mattek.com), see Fig. 1.

2.3.3. Reconstructed tissue test procedure

The preparation and maintenance of the tissues were performed according to the protocol provided by the manufacturer (MatTek Corp., 2017). After preincubation in fresh media following transportation, the tissues were exposed for 24 h to the selected tested samples (topical application, 100% aqueous extracts, 50 µl per tissue). After exposure, the culture medium beneath the tissues was recovered and analyzed for the presence of inflammatory biomarkers by ELISA and penetrated compounds by HPLC-TOF-MS. The viability of tissues was determined using MTT assay, based on the enzymatic reduction of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to formazan salt by living cells. The formazan concentration was determined by measurement of optical density (OD) at 570 nm by Spectrophotometer Varian UV-VIS CARY 1E. The OD values obtained for each test sample were used to calculate the percentage of viability compared to untreated control, which is set at 100%. Viability decreased under 70% of untreated control is considered to prove toxicity/irritation.

2.3.4. Immunochemical analysis of inflammatory biomarkers

The Quantikine™ ELISA method (RnDSystems.com) was used for detection of natural human cytokines. Concentrations of human IL-1α, TNF-α, IL-6 and IL-8 in the culture media beneath the tissues after 24 h incubation with selected samples were analyzed using the microplate solid-phase ELISA for each corresponding analyte, with colorimetric quantification performed with the use of Biotec Eon™ High Performance Microplate Spectrophotometer at 450 nm. The quantitative data for

exposed tissues were compared to the cytokine concentrations for negative control (100%) and interpreted as relative values. Results with two-fold increase and higher were considered to be significant.

2.3.5. XenoScreen YES/YAS test for evaluation of endocrine disruption potential

Commercially available yeast based reporter gene microplate assay XenoScreen YES/YAS (Xenometrix®, Switzerland), utilizing recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* stably transfected with human estrogen receptor (hERα) and androgen receptor (hAR), was performed according to the supplied standard operating procedure (Xenometrix, 2017). DMSO

(1%) was used as solvent control. Briefly, yeast strains were pre-cultured at 31 °C on orbital shaker, until the mean value of OD (690 nm), measured by Biotec Eon™ High Performance Microplate Spectrophotometer, reached at least 0.2 confirming adequate culture density. Consequently, the extracts in DMSO (concentration range from 0.03% up to 1%, the highest nontoxic concentration of DMSO) and test controls relevant to each assay (17β-estradiol, 5α-dihydrotestosterone, hydroxytamoxifen, flutamide) were diluted and transferred to 96-well test plates. Yeast culture was added in the amount of 100 µl per well. During 48 h incubation, ligands present in the sample bind to the corresponding receptors. After the binding of a ligand, the hERα and hAR interact with response elements on the lacZ expression plasmid and modulate the transcription of the lacZ reporter gene, resulting in β-galactosidase secretion into the medium and conversion of the yellow substrate (chlorophenol red-β-D-galactopyranoside) into a red product, quantified colorimetrically (Biotec Eon™) at 570 nm. The measured OD (570 nm) correlates with the amount of secreted β-galactosidase, indicating the interaction of the sample with the corresponding receptor. Growth factor (G) for each sample was calculated as viability of sample/solvent control (1% DMSO), represented by the OD value measured at 690 nm. Induction ratio (IR), characterizing the induction of endocrine activity, was calculated as 1/G x net absorbance of the sample at 570 nm–690 nm/net absorbance of the solvent control at 570 nm–690 nm.

2.4. Chemical analyses

2.4.1. Non-targeted HPLC-TOF-MS screening of extractable compounds and tissue culture media

250 µl of the extract or culture medium sample was mixed with 750 µl of acetone. The resulting solution was centrifuged at –10 °C and subsequently analyzed using HPLC Agilent 1290 coupled to TOF-MS Agilent 6220. Chromatographic separation took place on Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 150 mm, 2.7 µm particle size) column using a gradient of (A) ultrapure water and (B) methanol delivered at flow 0.4 ml/min. Full negative spectra in the range 100–1700 amu were acquired and on-

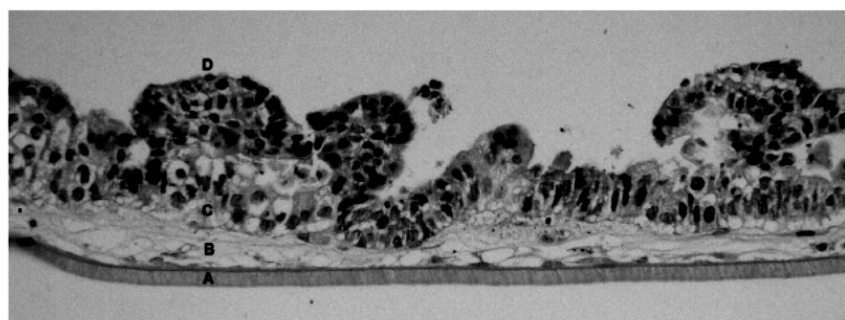


Fig. 1. Histological section of the full-thickness EpiIntestinal tissue (SMI-100-FT) model. H&E staining showing the columnar epithelium forming villi-like structures and underlying fibroblasts (A - membrane, B - fibroblasts, C - columnar epithelium, D - villi-like structures).

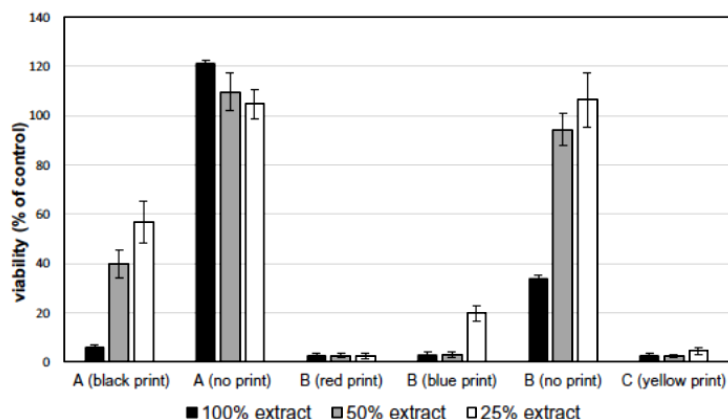


Fig. 2. Cytotoxicity of selected sample extracts in the 3T3 NRU cytotoxicity assay (24 h exposure) expressed as mean \pm SD, $n = 4$. Samples were tested as undiluted (100% extracts) and diluted in DMEM without serum (50% and 25% extracts).

line recalibrated by the mass reference solution (Agilent Technologies) analyzed simultaneously with the samples. The data were subjected to automated spectral deconvolution, monoisotopic mass extraction and probable elemental composition generating by MassHunter 5.0. software.

2.4.2. Targeted analyses of paper samples

The analyses were carried out according to Vavrouš et al. (2016). One portion of the extract described in the Sample extraction section was diluted by ultrapure water 1:1 (v/v), centrifuged and analyzed by HPLC Agilent 1290 coupled to MS/MS Agilent 6490. The analytes were separated on the Poroshell 120 EC-C18 (3.0 \times 150 mm, 2.7 μ m particle size) column using a gradient of (A) 2 mmol/l ammonium acetate in ultrapure water and (B) methanol delivered at flow 0.4 ml/min. The method scope was 15 polyfluoroalkylated compounds and 3 bisphenols.

The second portion of the extract was dried over MgSO₄ and analyzed by GC Trace 1310 coupled to MS/MS TSQ Quantum XLS Ultra. Rxi-PAH column (30 m long, 0.25 mm i.d., 0.10 mm film thickness, Restek), helium carrier gas (1 ml/min) and oven temperature program from 50 °C to 325 °C were used for separation. The method scope was 4 ink photoinitiators, 6 dialkyl phthalates, and 18 polycyclic aromatic hydrocarbons.

3. Results

3.1. 3T3 NRU cytotoxicity

Of the 231 tested samples, only 88 undiluted sample extracts were non-cytotoxic (i.e. viability of the cell culture was higher than 70%), which represents 38.0% of all the tested samples. Extracts of 43 samples were mildly cytotoxic (18.6%), 24 samples moderately cytotoxic (10.4%) and 76 samples severely cytotoxic (32.3%), with majority of the cytotoxic samples being printed (115 samples, i.e. 80.4% of all the cytotoxic samples). Three samples of extensively coloured napkins with high cytotoxicity, with and without print, were selected for further testing for each colour (in total 6 extracts). The viability of tested extracts, expressed as percentage of untreated control viability, is depicted in Fig. 2. Compared to non printed parts of the samples, the printed parts exhibited significantly high cytotoxicity for red, blue and yellow and substantial cytotoxicity for black colour.

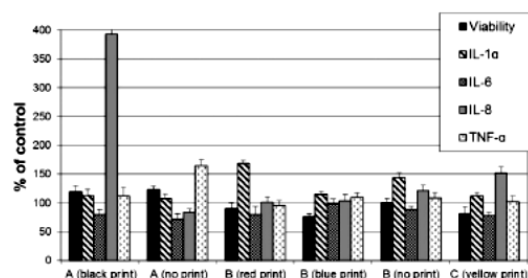


Fig. 3. EpiIntestinal FT viability and cytokine release after 24 h exposure of selected extracts, expressed as mean \pm SD, $n = 3$.

3.2. Reconstructed tissue model EpiIntestinal FT

The results of EpiIntestinal FT tissue viability and cytokine release following application of the selected extracts (samples A, B, C) are summarized in Fig. 3. After 24 h treatment with 100% extracts of the selected samples, the viability of the treated tissues did not decrease under 70% in comparison with the untreated control. The lowest viability was recorded in case of samples B (blue print) - 76.3% and C (yellow print) - 80.3% of control. After application of sample A (black print), the release of cytokine IL-8 was significantly increased almost 4-fold in comparison to the untreated control. The amounts of other released cytokines IL-1 α , IL-6 and TNF- α were not significantly different from the untreated control, they were either slightly lower or higher than control, nevertheless never reaching at least a 2-fold increase.

3.3. Endocrine disruption screen XenoScreen YES/YAS

The experiments performed in order to evaluate agonistic/antagonistic interactions with human estrogen and androgen receptors yielded very weak or negative results for all of the selected samples with the exception of sample A (black print) which showed androgenic response. Induction ratios of solvent control (1% DMSO), positive controls (at defined concentrations [mol/l]) and extracts (at concentrations representing the % of extract used for chemical analysis) are indicated in Table 1.

Table 1
Induction ratios obtained in agonist and antagonist assays (mean of duplicate wells).

YES agonist assay: induction ratio				
1% DMSO (solvent control)	0.634	0.635	0.751	0.861
17- β estradiol [mol/l]	3.16×10^{-10}	1×10^{-9}	3.16×10^{-9}	1×10^{-8}
	4.091	4.455	4.944	5.099
Extracts	0.316%	1%	3.16%	10%
A (no print)	0.682	0.635	0.632	0.617
A (black print)	0.613	0.640	0.693	0.742
B (red print)	0.671	0.608	0.766	0.810
B (blue print)	0.563	0.600	0.542	0.870
B (no print)	0.636	0.625	0.600	0.602
C (yellow print)	0.577	0.665	0.648	0.697
YES antagonist assay: induction ratio				
1% DMSO (solvent control)	5.758	5.377	5.644	4.831
4-hydroxytamoxifen [mol/l]	3.16×10^{-7}	10^{-6}	3.16×10^{-6}	10^{-5}
	2.530	1.611	1.437	1.504
Extracts	0.316%	1%	3.16%	10%
A (no print)	4.651	4.612	4.762	4.150
A (black print)	4.851	4.729	5.333	5.272
B (red print)	3.797	4.506	5.973	8.141
B (blue print)	3.782	4.679	4.728	7.270
B (no print)	4.271	4.537	4.500	4.399
C (yellow print)	4.525	4.078	4.519	6.083
YAS agonist assay: induction ratio				
1% DMSO (solvent control)	0.993	0.997	0.940	0.894
5 α -dihydrotestosterone [mol/l]	3.16×10^{-8}	10^{-7}	3.16×10^{-7}	10^{-6}
	3.857	3.665	3.316	3.119
Extracts	0.316%	1%	3.16%	10%
A (no print)	1.018	0.997	0.940	0.894
A (black print)	0.771	1.071	1.454	2.219
B (red print)	0.679	0.888	1.270	1.166
B (blue print)	0.760	0.778	0.912	1.354
B (no print)	1.077	1.021	0.990	0.966
C (yellow print)	0.760	0.778	0.909	1.301
YAS antagonist assay: induction ratio				
1% DMSO (solvent control)	3.825	3.765	3.810	3.456
Flutamide [mol/l]	3.16×10^{-6}	10^{-5}	3.16×10^{-5}	10^{-4}
	2.535	1.694	0.935	0.755
Extracts	0.316%	1%	3.16%	10%
A (no print)	3.825	3.765	3.810	3.456
A (black print)	3.794	2.914	2.698	2.340
B (red print)	2.436	2.917	4.518	3.677
B (blue print)	2.520	2.676	3.188	4.606
B (no print)	3.458	3.379	3.174	3.231
C (yellow print)	2.563	2.240	3.230	4.519

In the YES agonist assay none of the extracts showed estrogenic response indicated by increased IR comparing to 17- β estradiol as positive control. In the YES antagonist assay only extracts B (red print) and B (blue print) showed very weak anti-estrogenic response at concentration 0.316% comparing to 4-hydroxytamoxifen as positive control. Weak increase of agonistic activity of the internal standard (17 β -estradiol present in the media as a strong agonist at concentration 10^{-9} mol/l) was identified in case of extracts B (red print), B (blue print), C (yellow print) at 10% concentration.

In the YAS agonist assay, weak dose-dependent androgenic response in case of extract A (black print) was identified comparing to 5 α -dihydrotestosterone (DHT) as positive control. Extracts B (red print), B (blue print), C (yellow print) showed also very weak agonistic responses. In the YAS antagonist assay, weak but dose-dependent anti-androgenic response was identified in case of extract A (black print) comparing to flutamide as positive control. Weak anti-androgenic

responses at low concentrations were identified in case of extracts B (red print), B (blue print) and C (yellow print).

3.4. Chemical analyses

An example of HPLC-TOF-MS analysis of sample A (black print), applied on Epilntestinal FT model, is shown in Fig. 4. The resulting chromatograms and deconvoluted compound signals (data not shown) revealed a number of chemical compounds detected in all of the evaluated samples (extract, medium with penetrated compounds from the extract and control medium from tissues treated with deionized water). While there were some extra signals in the black printed paper extract, these signals were not detected in the medium collected from underneath the tissues after application of the extract. The chromatographic profiles of the medium after application of extract A (black print) and control medium after application of deionized water were practically the same, meaning that no detectable compounds penetrated from the extract through the model. Unfortunately, it was not possible to identify any of the peaks because of the weak or no match between mono-isotopic mass, probable elemental composition and/or chemical compound.

In order to learn more about the composition of the printed napkins, targeted chemical analyses were performed on the six selected extracts. Total of 13 compounds were identified in the printed samples and are listed in Table 2, while other target compounds were below the LOQs in all samples. All the tested samples contained at least one phthalate and photoinitiator. Sample A (black print) exhibited generally the highest levels of the detected analytes. Polycyclic aromatic hydrocarbons in significant concentrations were identified exclusively in this sample.

4. Discussion

Food contact materials are expected to be safe avoiding human exposure to undesirable substances migrating from the packaging during contact with food and inducing systemic effects via the GIT. This study was aimed on the assessment of potential health risks of paper-based FCMs with regard to released chemicals, implementing a step-wise approach combining chemical and biological procedures.

The cytotoxicity assays are generally used as first-line tests for assessment of basal toxicity of e.g. medical devices, consumer products such as cosmetics, toys and articles for children under 3 years of age, or other materials expected to come into direct contact with human body cells and tissues (Tomankova et al., 2011; Vinken and Blaauboer, 2017; Almeida et al., 2017). In our study, for the 3T3 NRU cytotoxicity assay sample extraction in culture medium, a polar extractant, was used in order to mimic relevant biological availability and realistic exposure pathways, while avoiding the toxicity of other extract vehicles more suitable for chemical analyses. The results of the presented study verified high sensitivity of the 3T3 NRU cytotoxicity test enabling to detect minor differences in the toxicity potential of paper samples. From the total of 231 samples, three samples of extensively coloured napkins with high cytotoxicity were selected for further separate testing of each colour resulting in 6 extracts. The aim was identification of their potential biological effects and presence of selected chemicals with an expected migration potential.

With the aim to evaluate the effects of the extracts (i.e. mixtures of unknown composition, potentially consisting of undesirable chemicals responsible for adverse effects) on GIT tissues, the study on reconstructed human model Epilntestinal FT was performed. The 3D reconstructed model of human intestine provides more realistic tissue response in comparison with the isolated fibroblast cell monolayer 2D culture. Three-dimensional models differ from standard 2D cultures mainly in cell-cell interactions or cellular mechanics. Controlled in vitro conditions and specific scaffolds allow the polarization of the cells, enabling them to differentiate in an organized tissue complex with appropriate morphologies, to migrate, communicate, mature, present

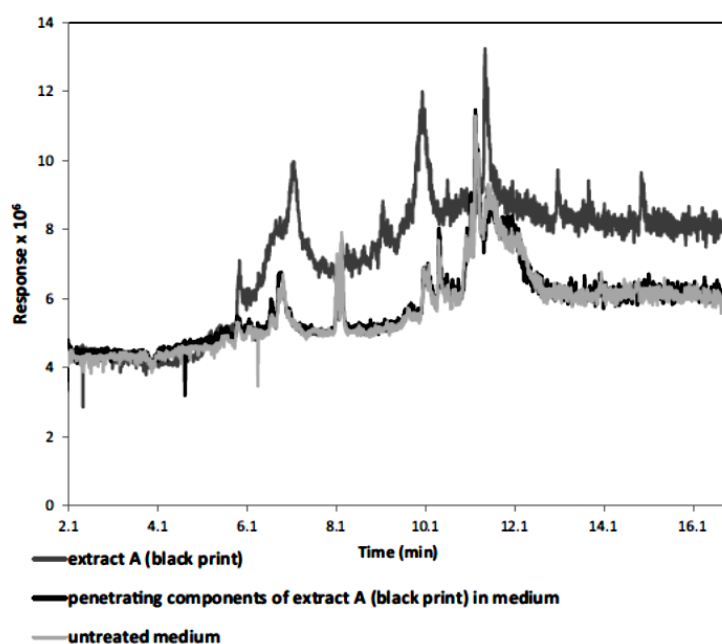


Fig. 4. Total ion current chromatogram of the applied extract A (black print), culture medium containing components of the applied extract A (black print) which have penetrated through the reconstructed tissue model EpilIntestinal FT, and control culture medium from tissue models treated with deionized water.

more biochemical factors and tissue-specific functions, e.g. barrier function, stress response, regeneration, advanced signaling or management of nutrients and waste due to the cell gradient, i.e. penetration, absorption, excretion (Nam et al., 2014; Duval et al., 2017). Histological cross-sections showed that EpilIntestinal tissues closely resemble native human small intestinal tissue, form brush borders, tight junctions, mucous secretory granules, etc. Characterization of this in vitro small intestinal tissue model showed interesting toxicological endpoints to be further studied, e.g. induced upregulation of cytokines such as IL-6, IL-8 and GRO- α , synthesis of tight-junctions or variations of epithelial permeability (Ayeahunie et al., 2017; Markus et al., 2017).

In our study the extracts severely cytotoxic in the 3T3 NRU assay did not affect the viability of the complex human tissue despite prolonged exposure for 24 h due to its barrier function affecting the

bioavailability of the extracted components in the tissue. The ELISA immunoassay of the culture medium obtained after the 24 h exposure of EpilIntestinal to the 6 selected extracts revealed a significant increase of the inflammatory cytokine IL-8 only for the sample A (black print). The intestinal epithelial barrier is maintained by expression of tight junctions that connect adjacent epithelial cells and seal the paracellular space. Release of specific cytokines is critical for the maintenance of intestinal barrier function through promoting antipathogen responses and regeneration of epithelial tissues. Disruption or alterations of these processes, including cytokine release, may result in alterations of epithelial permeability or improper immune responses leading to inappropriate inflammatory reactions. Interleukin-8 has been found to function as an attractant of polymorphonuclear inflammatory leukocyte infiltrate, contributing in regulation of immune pathways, pro-

Table 2

Occurrence of analytes quantified in selected paper samples with concentrations expressed in ng/g.

Chemical group	Compound	Samples						LOQ
		A Black print	A No print	B Red print	B Blue print	B No print	C Yellow print	
Dialkyl phthalates	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390	1200	< LOQ	150	120	230	100
	Diethyl phthalate	520	73	220	180	70	120	31
	Diisobutyl phthalate	1800	280	1000	530	< LOQ	680	110
	Diisononyl phthalate	< LOQ	230	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	200
	Di-n-butyl phthalate	2400	250	1200	400	< LOQ	350	190
Ink photoinitiators	Benzophenone	1300	160	220	300	170	233	15
	Ethyl-4-dimethylamino benzoate	6.0	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	4.0
Polycyclic aromatic hydrocarbons	Naphthalene	< LOQ	< LOQ	110	< LOQ	< LOQ	< LOQ	29
	Acenaphthylene	130	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	16	7.2
	Anthracene	150	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	19	5.7
	Fluoranthene	270	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	5.6
	Pyrene	1000	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	5.1
Other	Anthraquinone	37	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	58	18

inflammatory or tolerogenic responses, resulting in the maintenance of intestinal homeostasis (Brenner et al., 2014; Elshaer and Begun, 2017; Wang et al., 2017).

Our results showed that although the cytotoxicity of the black printed paper extract in the 3T3 NRU assay was relatively lower in comparison with red, blue and yellow paper samples and the viability of EpilIntestinal tissues was not affected, the elevated IL-8 suggests a latent potential of innate immune reaction in response to the black printed extract (i.e. a mixture of unknown composition, presumably containing chemicals responsible for the effect). Exhaustive identification of the extract composition was not the subject of this study, however, the non-targeted HPLC-TOF-MS analysis of the 6 selected extracts and the culture medium after exposure of EpilIntestinal tissues to the extracts was performed, in order to evaluate the penetration potential of the extract components through the tissues. This method distinguished between the chemical composition of the tested extract, culture medium containing compounds after penetration through the reconstructed tissue, and untreated culture medium, however, no significant penetration of xenobiotics has been observed, indicating appropriate barrier properties of the reconstructed tissues which mimic the protective function of native gut mucosal intestinal barrier in vivo. Aqueous extracts have been applied on the EpilIntestinal tissues because of initial considerations of biorelevance, bioavailability and the foreseen biological exposure scenario in the gut. Organic solvents as methanol, ethanol, DMSO or acetonitrile, used for extraction of lipophilic substances for chemical analyses are not relevant for testing bioavailability to estimate possible exposure under biological conditions in the GIT. Therefore, the applied aqueous extracts in our study may not contain organic (lipophilic) substances in sufficient amounts to be detected by targeted LC and GC methods and the above reported biological effects in cytotoxicity and EpilIntestinal tests are likely to be elicited by combined effects of a cocktail of water-soluble chemicals at very low concentrations, none of which could be identified by the non-targeted HPLC-TOF-MS analysis. HPLC-TOF-MS did not prove to be an effective tool for substance identification in this study, however, it may be used as a screen method to detect the total penetration potential of samples of unknown composition. The results obtained with the aqueous extracts, however, suggest in agreement with other studies (Ayeahunie et al., 2018) that the EpilIntestinal tissue is capable of modeling innate tissue responses, including immune reactions induced by combined effects of substances at very low concentrations, and can be a useful tool used to study the complex interactions of human intestinal epithelium with xenobiotics and samples of undefined composition. Current literature proposes further intensive research focused on intestinal health, as it seems to be an underappreciated target in the toxicity assessment. Results from recent studies suggest that not only food contaminants, but also food additives or substances migrating from food contact materials may adversely affect intestinal junction leakage resulting in intestinal entry of foreign antigens which might subsequently activate the autoimmune cascade (Lerner and Matthias, 2015; Groh et al., 2017).

A number of substances which are suspected of induction of systemic effects such as endocrine disruption were recently identified in paper FCMS, as a result of the manufacturing process (Vápenka et al., 2016; ECHA et al., 2018; EU, 2018). The YES/YAS screens are widely used in spite of limitations such as problems with materials that have fungicidal activity or inhibit cell proliferation, solubility, permeability or transport across the cell wall. Their advantage is the absence of complex gene-regulating networks in the yeast cells ensuring that no cross talk is possible between other hormonal pathways and only the respective hormonal signaling (i.e. receptor binding) is captured. Variants of the yeast-based assays (*Saccharomyces cerevisiae* and *Axiala adenivorans*) carrying the human ER α -receptor have recently been standardised within the International Organization for Standardization in ISO 19040 series (ISO, 2018). The YES is already included in the OECD Conceptual Framework, and both YES and YAS assays could be

considered to be functionally similar to the ER and AR stably transfected transactivation assays (OECD, 2018).

Our YES/YAS test results confirmed weak endocrine activity of printed extracts, i.e. antiestrogenic, antiandrogenic and androgenic, the most prominent being recorded for the sample A (black print). The androgenic result is unexpected, as most of the contaminants detected in FCMS have been previously reported as anti-androgenic. Many of the contaminants expected to be released from food contact materials (e.g. photoinitiators, phthalates, bisphenols, polyaromatic hydrocarbons) have been previously reported to react with estrogen or androgen receptors (Vinggaard et al., 2000; Tarnow et al., 2016; Peijnenburg et al., 2010; Cavanagh et al., 2018; Kharlyngdoh et al., 2018; Yost et al., 2019). There is still very little data in the literature reporting contaminants with agonist activity to the androgen receptor, most of the substances are widely recognized as anti-androgens. A few compounds of the same classes as were detected in our study in the black-printed sample (e.g. benzo(a)pyrene or some benzophenones) were described to show unexpected very weak agonistic activity (Kawamura et al., 2005; Villeneuve et al., 2019). As androgen agonists, some brominated flame retardants (e.g. 1, 2-dibromo-4-(1, 2-dibromoethyl) cyclohexane), photoinitiators, polychlorinated biphenyls, fatty acid methyl esters and herbicides were identified very recently (Peijnenburg et al., 2010; Hao et al., 2016; Lynch et al., 2017; Kharlyngdoh et al., 2018; Zhang et al., 2018). Androgen receptor agonists were found to cause additive responses in a mixture (Blake et al., 2010). In our study, the results of YES antagonistic assay indicated possible additive effects of (un)identified components in the extracts, resulting in increased agonist activity of the internal standard (17 β – estradiol present in the media as a strong agonist at concentration 10⁻⁹ mol/l).

The six extracts of the printed napkins were subjected to parallel chemical analyses, focused on selected groups of chemicals previously reported to migrate from FCMS and simultaneously exhibit endocrine or immunomodulatory activity, in order to identify the most chemically loaded samples. Quantification of selected contaminants using targeted LC and GC methods after solvent extraction confirmed the content of phthalates and photoinitiators at low concentrations in all samples, including those with no print, confirming their regular presence in the raw paper material used in the manufacturing process (see Table 2). The highest content of phthalates, benzophenone and several PAHs including pyrene was found in the sample A (black print), a party napkin with extensive black printing. This finding may explain the increase of IL-8 in EpilIntestinal tests as PAHs have been reported to have immunomodulatory effects due to upregulating mRNA level and inducing secretion of not only IL-8, but also several other cytokines (Pei et al., 2002; Tamaki et al., 2004; Goulaouic et al., 2008; Plé et al., 2015). Numerous studies confirmed, that phthalates may affect cell differentiation and regenerative and inflammatory processes both in vitro and in vivo (Hansen et al., 2015; Robinson and Miller, 2015; Kurohane et al., 2017). The presence of higher content of bis(2-ethylhexyl)phthalate and diisonyl phthalate in sample A (no print) compared to sample A (black print) was surprising. We speculate that the input raw material quality and manufacture technology result in non-homogeneity of the finished product and/or that the following printing process may affect the release of these phthalates during extraction (e.g. due to reaction with the ink components).

In our study, the black printed sample turned out to be the most hazardous FCM with substantial cytotoxicity, eliciting IL-8 in reconstructed human intestinal model and exhibiting also weak agonistic and antagonistic activity to human androgen receptor. The extract of this sample contained the highest levels of organic xenobiotics suspected of reprotoxicity or other adverse toxicological effects. Heavily printed uncoated FCMS are recognized not to be suitable for direct contact with food in compliance with the Industry Guideline for the Compliance of Paper & Board Materials and Articles for Food Contact (2012). Particularly food with very high moisture content (for example liquid food or wet chilled products) might cause disintegration of the

material and extensive migration of xenobiotics into the food. For these food types coated paper and board is commonly used, and in the great majority of applications direct food contact is with a plastic layer, paraffin or wax emulsion enhancing water vapour, water and oil resistance (Nowacka et al., 2018).

Extracts of FCMs are mixtures containing unknown number and volume of unidentified active substances presumably in low concentrations, however, with possible supportive combined interactions resulting in overall biological effects. The mode of action has been established only for a limited number of chemicals but the effects of mixtures are becoming the focus of toxicology. Numerous studies on mixtures showed that substances in very low concentrations may exhibit combination biological effects, e.g. agonism, antagonism, additivity, synergism or potentiation. Increase of agonistic activity of internal standards in antagonist assays indicates possible additive effects of (un)identified substances present in the mixture (i.e., extract) at very low concentrations. Pleiotropic combined interactions of various potential ligands, present in the extract, must be considered, when evaluating samples representing mixtures. Current studies suggest novel methods for mixture evaluation, criticising previous approaches, e.g. additive models to be unable to represent the effects of partial agonists due to lesser efficacies compared to native hormones (SCHER, SCCS, SCENIHR, 2012; Brinkmann et al., 2018). Therefore, evaluation of biological effects with consequent chemical analysis detecting the most suspected compounds is a relevant approach for safety evaluation of chronic exposure in low doses (Balaguer et al., 2017; Gross et al., 2017).

Since the chemical identity of the majority of the migrating compounds from FCMs can not be established, the safety assessment based on toxicological data on individual compounds and determination of the respective ADI or TDI values is not feasible. This fact illustrates the need for a global safety assessment of the total migrates from food contact paper and effectivity of novel alternative methods able to evaluate the overall effects of mixtures in extracts and consumer products. A screening strategy including chemical analyses of FCMs and detection of their overall biological effects seems to be applicable to obtain basic data for the weight-of-evidence approach in safety assessment of consumer products.

Acknowledgement

The work was supported from ERDF/ESF project “International competitiveness of NIPH in research, development and education in alternative toxicological methods” (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000860).

References

- Almeida, A., Sarmiento, B., Rodrigues, F., 2017. Insights on *in vitro* models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. *Int. J. Pharm.* 519 (1–2), 178–185.
- Ayehunie, S., Stevens, Z., Landry, T., Armento, A., Klausner, M., Hayden, P., 2017. 3D-human small intestine model as an alternate to animal testing to predict drug toxicity, permeability, and metabolism. *Toxicol. Lett.* 280S, S271.
- Ayehunie, S., Landry, T., Stevens, Z., Armento, A., Hayden, P., Klausner, M., 2018. Human primary cell-based organotypic microtissues for Modeling small intestinal drug absorption. *Pharm. Res.* 35 (72). <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2362-0>. (Accessed 26.11.2018).
- Balaguer, P., Delfosse, V., Grimaldi, M., Bourguet, W., 2017. Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. *C. R. Biol.* 340 (9–10), 414–420.
- Biedermann, M., Grob, K., 2010. Is recycled newspaper suitable for food contact materials? Technical grade mineral oils from printing inks. *Eur. Food Res. Technol.* 230 (5), 785–796.
- Binderup, M.L., Pedersen, G.A., Vinggaard, A.M., Rasmussen, E.S., Rosenquist, H., Cederberg, T., 2002. Toxicity testing and chemical analyses of recycled fibre-based paper for food contact. *Food Addit. Contam.* 19 (Suppl), 13–28.
- Blake, L.S., Martinović, D., Gray, L.E.Jr., Wilson, V.S., Regal, R.R., Villeneuve, D.L., Ankley, G.T., 2010. Characterization of the androgen-sensitive MDA-kb2 cell line for assessing complex environmental mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (6), 1367–1376.
- Bradley, E.L., Stratton, J.S., Leak, J., Lister, L., Castle, L., 2013. Printing ink compounds in foods: UK survey results. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 6 (2), 73–83.
- Brenner, D.R., Scherer, D., Muir, K., Schildkraut, J., Boffetta, P., Spitz, M.R., Le Marchand, L., Chan, A.T., Goode, E.L., Ulrich, C.M., Hung, R.J., 2014. A review of the application of inflammatory biomarkers in epidemiologic cancer research. *Cancer Epidemiol. Biomarkers.* 23 (9), 1729–1751.
- Brinkmann, M., Hecker, M., Giesy, J.P., Ratte, H.T., Hollert, H., Preuss, T.G., 2018. Generalized concentration addition accurately predicts estrogenic potentials of mixtures and environmental samples containing partial agonists. *Toxicol. in Vitro* 46, 294–303.
- Cavanagh, J.E., Trought, K., Mitchell, C., Northcott, G., Tremblay, L.A., 2018. Assessment of endocrine disruption and oxidative potential of bisphenol-A, trichloran, non-ylphenol, diethylhexyl phthalate, galaxolide, and carbamazepine, common contaminants of municipal biosolids. *Toxicol. in Vitro* 48, 342–349.
- Duval, K., Grover, H., Han, L.H., Mou, Y., Pegoraro, A.F., Fredberg, J., Chen, Z., 2017. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)* 32 (4), 266–277.
- EC, 1994. European Parliament and Council Directive 94/62/EC of 20 December 1994 on packaging and packaging waste. *Off. J. Eur. Union L 365*, 1–29. 31.12.1994. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:01994L0062-20150526&from=EN> (Accessed 9.11.2018).
- EC, 2004. Regulation (EC) No. 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC. *Off. J. Eur. Union L 338*, 4–17. 13.11.2004. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R1935&from=EN> (Accessed 7.11.2018).
- EFSA, 2016. Recent developments in the risk assessment of chemicals in food and their potential impact on the safety assessment of substances used in food contact materials. *EFSA J.* 14(1), 4357, 1–28. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4357>. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4357> (Accessed 30.11.2018).
- Elsheer, D., Begun, J., 2017. The role of barrier function, autophagy, and cytokines in maintaining intestinal homeostasis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 61, 51–59.
- EU, 2011. Regulation (EU) No 10/2011 of the European Commission of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Off. J. Eur. Union L 12*, 1–89. 15.1.2011. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0010&from=EN> (Accessed 8.11.2018).
- EU, 2018. Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018 amending Annex II to Regulation (EC) No 1107/2009 by setting out scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties. *Off. J. Eur. Union L 101*, 33–36 Brussels.
- European Chemicals Agency (ECHA), European Food Safety Authority (EFSA), Joint Research Centre (JRC), 2018. Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of regulations (EU) no 528/2012 and (EC) no 1107/2009. *EFSA J.* 16 (6), 1–135. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311>. 5311.
- Fierens, T., Servaes, K., Van Holderbeke, M., Geerts, L., De Henuauw, S., Sioen, L., Vanermen, G., 2012. Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. *Food Chem. Toxicol.* 50 (7), 2575–2583.
- Goulaouic, S., Foucaud, L., Bennisroune, A., Laval-Gilly, P., Falla, J., 2008. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon black particles on pro-inflammatory cytokine secretion: impact of PAH coating onto particles. *J. Immunotoxicol.* 5 (3), 337–345.
- Groh, K.J., Muncke, J., 2017. *In vitro* toxicity testing of food contact materials: state-of-the-art and future challenges. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16 (5), 1123–1150.
- Groh, K.J., Guecke, B., Muncke, J., 2017. Food contact materials and gut health: implications for toxicity assessment and relevance of high molecular weight migrants. *Food Chem. Toxicol.* 109, 1–18 Pt 1.
- Gross, M., Green, R.M., Weltje, L., Wheeler, J.R., 2017. Weight of evidence approaches for the identification of endocrine disrupting properties of chemicals: review and recommendations for EU regulatory application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 91, 20–28.
- Hansen, J.F., Nielsen, C.H., Møller Brorson, M., Frederiksen, H., Hartoft-Nielsen, M.L., Rasmussen, A.K., Bendtzen, K., Feldt-Rasmussen, U., 2015. Influence of phthalates on *in vitro* innate and adaptive immune responses. *PLoS One* 10 (6), e0131168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131168>.
- Hao, M., Bryant, S.H., Wang, Y., 2016. Cheminformatics analysis of the AR agonist and antagonist datasets in PubChem. *J. Cheminform.* 8, 37. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0150-6>.
- ISO, 2009. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity. *ISO 6* (2009), 1–34.
- ISO, 2012. ISO 10993-12:2012. Biological evaluation of medical devices – part 12: sample preparation and reference materials. *ISO 7* (2012), 1–20.
- ISO, 2018. ISO 19040-1:2018. Water quality - determination of the estrogenic potential of water and waste water. Part 1: Yeast Estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*). *ISO 8* (2018), 1–58.
- Karmaus, A.L., Osborn, R., Krishan, M., 2018. Scientific advances and challenges in safety evaluation of food packaging materials: workshop proceedings. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 98, 80–87.
- Kawamura, Y., Mutsuga, M., Kato, T., Iida, M., Tanamoto, K., 2005. Estrogenic and anti-androgenic activities of Benzophenones in human Estrogen and androgen receptor mediated mammalian reporter gene assays. *J. Health Sci.* 51 (1), 48–54.
- Kharylgydoh, J.B., Pradhan, A., Olsson, P.E., 2018. Androgen receptor modulation following combination exposure to brominated flame-retardants. *Sci. Rep.* 8 (1) 4843. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5859252/> (Accessed 1.3.2019).
- Kurohane, K., Sekiguchi, K., Ogawa, E., Tsutsumi, M., Imai, Y., 2017. Dibutyl phthalate rather than monobutyl phthalate facilitates contact hypersensitivity to fluorescein isothiocyanate in a mouse model. *Biol. Pharm. Bull.* 40 (11), 2010–2013.
- Lerner, A., Mathias, T., 2015. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* 14 (6), 479–489.
- Lynch, C., Sakamuru, S., Huang, R., Stavreva, D.A., Varticovski, L., Hager, G.L., Judson,

- R.S., Houck, K.A., Kleinstreuer, N.C., Casey, W., Paules, R.S., Simeonov, A., Xia, M., 2017. Identifying environmental chemicals as agonists of the androgen receptor by using a quantitative high-throughput screening platform. *Toxicology* 385, 48–58.
- Markus, J., Landry, T., Stevens, Z., Klausner, M., Hayden, P., Ayehunie, S., 2017. 3-D human small intestine tissue to study ligand induced acute and chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *Toxicol. Lett.* 280S, S171.
- MatTek Corporation, 2017. Protocol: EpIntestinal™ Small Intestine Full Thickness Tissue Model (SMI-100-FT) Use Protocol. MK-24-007-0131, 11/10/2017. pp. 1–5.
- Nam, K.H., Smith, A.S., Lone, S., Kwon, S., Kim, D.H., 2014. Biomimetic 3D tissue models for advanced high-throughput drug screening. *J. Lab. Autom.* 20 (3), 201–215.
- Nerin, C., Alfaro, P., Aznar, M., Domene, C., 2013. The challenge of identifying non-intentionally added substances from food packaging materials: a review. *Anal. Chim. Acta* 775, 14–24.
- Nowacka, M., Rybak, K., Wiktor, A., Mika, A., Boruszewski, P., Woch, J., Przybysz, K., Witrowa-Rajchert, D., 2018. The quality and safety of food contact materials – paper and cardboard coated with paraffin emulsion. *Food Control* 93, 183–190.
- OECD, 2018. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. OECD Series on Testing and Assessment, No. 150. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.
- Ozaki, A., Yamaguchi, Y., Fujita, T., Kuroda, K., Endo, G., 2004. Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1323–1337.
- Pei, X.H., Nakanishi, Y., Inoue, H., Takayama, K., Bai, F., Hara, N., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce IL-8 expression through nuclear factor kappaB activation in A549 cell line. *Cytokine* 19 (5), 236–241.
- Peijnenburg, A., Riethof-Poortman, J., Baykus, H., Portier, L., Bovee, T., Hoogenboom, R., 2010. AHR-agonistic, anti-androgenic, and anti-estrogenic potencies of 2-isopropylthioxanthone (ITX) as determined by *in vitro* bioassays and gene expression profiling. *Toxicol. in Vitro* 24 (6), 1619–1628.
- Plé, C., Fan, Y., Yahia, S.A., Vornig, H., Everaere, L., Chenivesse, C., Balsamelli, J., Azaoui, I., de Nadai, P., Wallaert, B., Lazennec, G., Tscopoulos, A., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons reciprocally regulate IL-22 and IL-17 cytokines in peripheral blood mononuclear cells from both healthy and asthmatic subjects. *PLoS One* 10 (4), e0122372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122372>.
- Robinson, L., Miller, R., 2015. The impact of Bisphenol A and phthalates on allergy, asthma, and immune function: a review of latest findings. *Curr. Environ. Health Rep.* 2 (4), 379–387.
- Rosenmai, A.K., Bengtstrom, L., Taxvig, C., Trier, X., Petersen, J.H., Svngen, T., Bindeup, M.L., van Vugt-Lussenburg, B.M.A., Dybdahl, M., Granby, K., Vinggaard, A.M., 2017. An effect-directed strategy for characterizing emerging chemicals in food contact materials made from paper and board. *Food Chem. Toxicol.* 106, 250–259.
- Sanches-Silva, A., Andre, C., Castanheira, I., Cruz, J.M., Pastorelli, S., Simoneau, C., Paseiro, P., 2009. Study of the migration of photoinitiators used in printed food-packaging materials into food simulants. *J. Agric. Food Chem.* 57 (20), 9516–9523.
- SCHER, SCCS, SCENIHR, 2012. Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. European Commission Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) <https://doi.org/10.2772/21444>. <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/f1ab4074-6ce5-4687-89b7-fbd438943b54/language-en> (Accessed 30.11.2018).
- Severin, I., Souton, E., Dahbi, L., Chagnon, M.C., 2017. Use of bioassays to assess hazard of food contact material extracts: state of the art. *Food Chem. Toxicol.* 105, 429–447.
- Suciu, N.A., Tiberto, F., Vasileiadis, S., Lamastra, L., Trevisan, M., 2013. Recycled paper-paperboard for food contact materials: contaminants suspected and migration into foods and food simulants. *Food Chem.* 141 (4), 4146–4151.
- Tamaki, A., Hayashi, H., Nakajima, H., Takii, T., Katagiri, D., Miyazawa, K., Hirose, K., Onozaki, K., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbon increases mRNA level for interleukin 1 beta in human fibroblast-like synoviocyte line via aryl hydrocarbon receptor. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (3), 407–410.
- Tarnow, P., Hutzler, C., Grabiger, S., Schön, K., Tralau, T., Luch, A., 2016. Estrogenic activity of mineral oil aromatic hydrocarbons used in printing inks. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147239>.
- The Confederation of European Paper Industries, 2012. Industry Guideline for the Compliance of Paper & Board Materials and Articles for Food Contact: Issue 2 EN/DE/ES/IT/PL/NL. <http://www.cepi.org/system/files/public/documents/publications/foodcontact/2012/Industry%20guideline-updated2012final.pdf> (Accessed 8.11.2018).
- Tomankova, K., Kejløv, K., Binder, S., Daskova, A., Zapletalova, J., Bendova, H., Kolarova, H., Jirova, D., 2011. *In vitro* cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. *Toxicol. in Vitro* 25 (6), 1242–1250.
- Triantafyllou, V.I., Akrida-Demertzi, K., Demertzis, P.G., 2007. A study on the migration of organic pollutants from recycled paperboard packaging materials to solid food matrices. *Food Chem.* 101, 1759–1768.
- Van Bossuyt, M., Van Hoeck, E., Vanhaecke, T., Rogiers, V., Mertens, B., 2016. Printed paper and board food contact materials as a potential source of food contamination. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 81, 10–19.
- Van Bossuyt, M., Van Hoeck, E., Vanhaecke, T., Rogiers, V., Mertens, B., 2018. Prioritizing Substances of Genotoxic Concern for In-depth Safety Evaluation Using Non-animal Approaches. ALTEX preprint <https://doi.org/10.14573/altex.1810011>. https://www.sciensano.be/sites/www.wiv-isp.be/files/van_bossuyt_2019a.pdf (Accessed 26.2.2019).
- Vápenka, L., Vavrouš, A., Votavová, L., Kejløv, K., Dobiáš, J., Sosnovcová, J., 2016. Contaminants in the paper-based food packaging materials used in the Czech Republic. *J. Food Nutr. Res.* 55 (4), 361–373.
- Vavrouš, A., Vápenka, L., Sosnovcová, J., Kejløv, K., Vrbík, K., Jírová, D., 2016. Method for analysis of 68 organic contaminants in food contact paper using gas and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Control* 60, 221–229.
- Villeneuve, L., Murphy, M.B., Lam, W.H., Jones, P.D., Giesy, J.P., 2019. Screening for Androgen and Glucocorticoid Receptor (Ant)Agonists Using MDA-kb2 Cells. <https://msu.edu/~giesy/Projects/Presentations/ED-PS-MDA-01.pdf> (Accessed 1.3.2019).
- Vinggaard, A.M., Hnida, C., Larsen, J.C., 2000. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation *in vitro*. *Toxicology* 145 (2–3), 173–183.
- Vinken, M., Blaauboer, B.J., 2017. *In vitro* testing of basal cytotoxicity: establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. *Toxicol. in Vitro* 39, 104–110.
- Wang, Y., Mumm, J.B., Herbst, R., Kolbeck, R., Wang, Y., 2017. IL-22 increases permeability of intestinal epithelial tight junctions by enhancing Claudin-2 expression. *J. Immunol.* 199 (9), 3316–3325.
- Xenomatrix, 2017. XenoScreen YES/YAS Instructions for Use. Version 3.08, May 2017, 1–22.
- Yost, E.E., Euling, S.Y., Weaver, J.A., Beverly, B.E.J., Keshava, N., Mudipalli, A., Arzuaga, X., Blessinger, T., Dishaw, L., Hotchkiss, A., Makris, S.L., 2019. Hazards of diisobutyl phthalate (DIBP) exposure: a systematic review of animal toxicology studies. *Environ. Int.* 125, 579–594. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.09.038>.
- Zhang, C., Li, P., Wen, Y., Feng, G., Liu, Y., Zhang, Y., Xu, Y., Zhang, Z., 2018. The promotion on cell growth of androgen-dependent prostate cancer by antimony via mimicking androgen activity. *Toxicol. Lett.* 288, 136–142.
- Zülch, A., Piringer, O., 2010. Measurement and modelling of migration from paper and board into foodstuffs and dry food simulants. *Food Addit. Contam.* 27 (9), 1306–1324.

irritation assessment. The chemicals were tested in two independent runs by MatTek *In Vitro* Life Science Laboratories.

For the EpiOcular EIT (OECD TG 492), a sensitivity of 96.9% and specificity of 86.7% with an accuracy of 95% was obtained overall and for both runs separately (100% concordance). For the EpiOcular ET-50 method, the overall accuracy of 74.5%, an FNR of 3.1% (Classified versus Not classified) and FPR of 3.4% (Classified versus Not classified) were achieved. Furthermore, about 79% of the Cat 1 liquids and 69% of the Cat 1 solids and 68% of the Cat 2 liquids and about 61% of the Cat 2 solids were identified correctly. The results of these studies seem promising with regard to the evaluation of inclusion of these test methods in an integrated testing strategy (ITS) for eye irritation assessment.

This research was funded by CEFIC-LRI. We acknowledge Cosmetics Europe for their contribution in chemical selection. The research has been recently published in the special issue of *Toxicology in Vitro*, CON4EI: Consortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy, Edited by: An Van Rompay, Sandra Verstraelen. Volume 49, Pages 1-116 (June 2018).

L-04

SELECTED BISPHENOLS AND PHTHALATES SCREENED FOR ESTROGEN AND ANDROGEN DISRUPTION BY *IN SILICO* AND *IN VITRO* METHODS

Dvořáková M.^{1,2}, Kejlová K.¹, Rucki M.¹, Jírová D.^{1,2}
¹National Institute of Public Health, Šrobárova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic; ²Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic

Endocrine disruptors are substances capable to bind to specific receptors similarly to endogenous hormones, thus potentially contributing to endocrine system disturbances and consequent system disorders. Sources of exposure may come from industry or agriculture, including consumer products, e.g. food packaging materials, thermopaper, plastics, household products or cosmetics. Interaction of ligands with receptors is a molecular initiation event that leads to complex effects. The physiological receptor mechanism may be affected either by direct receptor binding of the exogenous ligand to the receptor, resulting in activation (agonistic activity) or inhibition (antagonistic activity), or consequent modulation of associated signaling pathways regulation. Human receptors may share ligands with variable affinity and efficacy. Certain substances may be persistent, resulting in bioaccumulation in the food chain as well as in the organism. Others may be quickly metabolized and act for a limited time. Therefore, exposure to endocrine disruptors cannot be simply investigated in humans since it is influenced also by individual environmental, medical and social factors. These facts complicate the detection of negative effects *in vivo*. Development and use of *in silico* screening tools and *in vitro* methods is therefore effective for first-level screening and should be used more intensively. In our pilot study, selected

bisphenols and phthalates were tested using OECD QSAR Toolbox, Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (OECD TG 455) and yeast-based microplate assay (in compliance with Draft ISO/DIS 19040) in order to determine the interactions of the tested chemicals with human estrogen and androgen receptors. *In vitro* results correlated well with *in silico* prediction for phthalates predicted as non binders, while predictions for bisphenols differed slightly. Both *in vitro* biological methods exhibited good concordance of results regarding the estrogenic activity. Minor discrepancies were detected for certain bisphenols due to cytotoxicity elicited in higher concentrations. Substances showing strong estrogenic activity exhibited parallel activity on the androgen receptor. The research article also summarizes recent developments in legislation with reference to *in vitro* methods suitable for screening of endocrine disruption.

Supported by ERDF/ESF project "International competitiveness of NIPH in research, development and education in alternative toxicological methods" (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000860).

L-05

FORMULATION OF APOFERRITIN NANOCARRIER WITH ENCAPSULATED ELLIPTICINE AND STUDY OF ITS PROPERTIES

Indra R.¹, Wilhelm M.¹, Černá T.¹, Heger Z.², Dostálová S.², Adam V.², Eckschlager T.³, Stiborová M.¹
¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague 2, Czech Republic; ²Department of Chemistry and Biochemistry, Laboratory of Metallomics and Nanotechnology, Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic; ³Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague 5, Czech Republic

One of the approaches to decrease the adverse effects of drugs is their encapsulation inside a suitable nanocarrier, allowing for a targeted delivery to tumour tissue whereas avoiding healthy cells. Apoferritin is the iron-free form of ferritin, a naturally occurring iron-storage protein. Using apoferritin as a nanocarrier has the potential to move undetected through the body without inducing any resistance from the immune system of the patient. Furthermore apoferritin can be modified with recognition ligands to achieve tumor-specific targeting. The simple-to-use encapsulation protocol (creating ApoElli) was developed and the prepared nanocarrier was characterized. The nanocarrier exhibits narrow size distribution, which suggests being suitable for entrapment of the hydrophobic molecule of ellipticine. The release of ellipticine at acidic (6.5) and neutral (7.4) pH was studied. Ellipticine is gradually released from its ApoElli form into the water environment under acidic pH; more than 80% ellipticine was released after 48 hrs incubation at pH 6.5. In contrast at pH 7.4 less than 20% was released. ApoElli is also stable after its storage at physiological pH (7.4) up to 1 month at 4 °C. The presence of membrane particles accelerates release

of ellipticine from Apo-Elli and makes it possible to be transferred into microsomes even at pH 7.4. Microsomal cytochromes P450 are capable of oxidizing free ellipticine and/or its ApoElli form to its metabolites and generating covalent ellipticine-derived DNA adducts, both under pH 7.4 and 6.5. The form of ellipticine plays essentially no role in these processes. The ApoElli is toxic to UKF-NB-4 neuroblastoma cancer cells but exhibits significantly lower toxicity for non-malignant cells (non-malignant fibroblasts, HDFn cells).

The work was supported by GACR (17-12816S) and Charles University (204025/2012).

L-06

APOFERRITIN NANOCAGE FOR ELLIPTICINE DELIVERY TO NEUROBLASTOMA CELLS

Černá T.^{1,2}, Hraběta J.², Indra R.¹, Heger Z.³, Adam V.³, Eckschlagner T.², Stiborová M.¹

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, 128 43 Prague, Czech Republic; ² Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Medical Faculty, Charles University and University Hospital Motol, 150 06 Prague, Czech Republic; ³ Laboratory Metallomics and Nanotechnology, Mendel University in Brno and Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic

Recently, nanoparticles have been widely investigated for delivery of anticancer drugs. Apoferritin is a natural nontoxic iron carrier and has a natural hollow structure that can be used to store small molecules such as cytostatics. The aim of our study was to compare the cytotoxic effects of anticancer drug ellipticine loaded in apoferritin (APOELLI) and free ellipticine (ELLI) on neuroblastoma cells UKF-NB-4, chemoresistant sublines derived from this cell line, and normal human fibroblasts (HDFn), as a model of non-malignant cells. We show here that the cytotoxicity of APOELLI is lower than cytotoxicity of free cytostatic, but APOELLI induces more double strand breaks than free ELLI in neuroblastoma cells. Moreover, cytotoxicity of drug loaded apoferritin is significantly lower for HDFns. Further, using fluorescence microscopy, we have shown that apoferritin can deliver drugs inside cells and the drug exerts their effect thereof. Fluorescence intensity of ELLI/APOELLI in nuclei of neuroblastoma cells is significantly higher than in those of HDFn, because ELLI/APOELLI is more sequestered in lysosomes in fibroblasts. The extent of APOELLI enter into the UKF-NB-4 cells correlated with formation of covalent ELLI-derived DNA adducts in these cells; the levels of ELLI-DNA adducts generated by APOELLI were 67% of those formed by free ELLI. The results found in this study seem to be promising, because encapsulation does not affect toxicity of cytostatic and improves drug stability. We suppose that apoferritin with encapsulated ELLI is targeted to the several cancer cells including neuroblastoma through receptors Tfr 1 and/or SCARA 5 which are expressed in many cancers.

Supported by the grant GACR 17-12816S and GAUK 998217.

L-07

DNA ADDUCTS FORMATION BY PLANT ARISTOLOCHIC ACID IS UNIQUE BIOMARKER OF EXPOSURE AND EXPLAIN THE INITIATION PHASE OF UPPER UROTHELIAL CANCER

Stiborová M.¹, Arit V.M.², Schmeiser H.H.³

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic; ²Analytical and Environmental Sciences Division, MRC-HPA Centre for Environment and Health, King's College London, London SE1 9NH, United Kingdom; ³German Cancer Research Center, 69120 Heidelberg, Germany

Aristolochic acid (AA) is an alkaloid causing aristolochic acid nephropathy (AAN) and Balkan endemic nephropathy (BEN) that are renal diseases often associated with upper urothelial cancer (UUC). The formation of covalent DNA adducts by carcinogens is considered to be one of the earliest steps in the initiation phase of cancer development. Moreover, the covalent binding of carcinogens to DNA, which is causally related to tumorigenesis, is now considered as a central dogma of chemical carcinogenesis. This belief is supported by various observations, such as the facts that: (i) the carcinogenic properties of many carcinogens is dependent upon their activation to reactive electrophilic derivatives, which react with nucleophilic sites within DNA; (ii) the extent of DNA adduct formation can frequently be correlated with the magnitude of carcinogenic responses; and (iii) mutations in certain tumour suppressor genes and the activation of several proto-oncogenes can be mediated by the interaction of carcinogens with DNA. However, since humans are exposed not only to one but to a complex mixture of carcinogens, direct proofs of an association of exposure to the development of a specific cancer type are rare. The plant carcinogen AA is one of the rare examples where a distinct environmental exposure is linked to tumour development in humans. This study demonstrates the significance of AA-derived DNA adducts in the aetiology of UUC leading to specific A:T to T:A transversion mutations (mutational signature) in AAN/BEN-associated tumours, which are otherwise rare in individuals with UCC not exposed to AA. Therefore, such DNA damage produced by AA-DNA adducts is one rare example of the direct association of exposure and cancer development (UUC) in humans, confirming that the covalent binding of carcinogens to DNA is causally related to tumourigenesis. Even though aristolochic acid I (AAI), the major component of the natural plant extract AA, might directly cause interstitial nephropathy, enzymatic activation of AAI to reactive intermediates capable of binding to DNA is a necessary step leading to the formation of AA-DNA adducts and subsequently AA-induced malignant transformation. Therefore, AA-DNA adducts can not only be utilized as biomarkers for the assessment of AA exposure and markers of AA-induced UUC, but also be used for the mechanistic evaluation of its enzymatic activation and detoxification. Differences in AA metabolism might be



39

Screening of endocrine disruptors and their impact on human health

Marketa Dvorakova^{1,2}, Kristina Kejlova¹, Marian Rucki¹, Hana Bendova¹, Pavel Kohout³, Jitka Tomesova³ and Dagmar Jirova^{1,2}

¹National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; ²Third Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic; ³Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

Endocrine disruptors are hormonally active substances, of natural or synthetic origin, affecting the endocrine (hormonal) systems of humans. They have been associated with clinically observed adverse developmental, reproductive, neurological and immune effects. It is a specific group of compounds, which may be the ligands of human estrogen or androgen receptors due to their molecular weight and structure, and thus, depending on the degree and frequency of exposure, have the ability to affect endocrine system either by blocking or activating the receptor. Growing evidence suggests that low concentrations under chronic exposure during developmental periods of the organism may result in adverse effects in later periods of life. Certain compounds with endocrine disrupting effects can be found in a number of chemical groups, e.g. steroids, cyclic hydrocarbons, phenols, flavonoids, phthalates, parabens, biocides, plasticizers, surfactants, fire retardants, distinct antimicrobials, UV filters, toxic metals and other substances. They may be released from products intended for consumers, e.g. cosmetics or toys, everyday items, household products, medical devices and other products coming from industry or agriculture. Packaging materials, from which the hazardous substances may migrate into finished products, may represent health risk as well. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals are found in environmental and biological samples, commercial and consumer products, food, and numerous other sources.

We have used *in silico* approach and two *in vitro* accessible tools suitable for detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals – ER TA assay (OECD TG 455) and the yeast based Xenoscreen YES/YAS assay (Xenometrix®). Bisphenol A and its analogues showed estrogenic activity, which may be similar to 17 β -estradiol and already legislatively regulated Bisphenol

A. All tested bisphenols showed agonistic and antagonistic activity to the human estrogen receptor. Only BPZ showed weak agonistic activity to the androgen receptor. Analogous chemicals, which are produced and available on the market, are suspected to be replacing those already evaluated and regulated (e.g. Bisphenol A) and thus should be of considerable interest for testing and evaluation. Chemicals with positive results in the *in vitro* systems are suspected to cause adverse effects *in vivo*. At the international level, the improvement of testing strategies and methods alternative to animal testing is highly required and has been discussed in the context of EU and global legislation. Increasing pressure on testing of endocrine disruption potential in the near future is very anticipated, along with efforts to reduce the potential exposure of humans, particularly of sensitive populations.

The research was supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (“National Institute of Public Health - NIPH, IN: 75010330”).

References

- Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B. and Heindel, J. J. (2011). *J Steroid Biochem Mol Biol* 127, 204-215.
Yang, C. Z., Yaniger, S. I., Jordan, V. C. et al. (2011). *Environ Health Perspect* 119, 989-996.
Rancière, F., Lyons, J. G. and Loh, V. H. Y. (2015). *Environ Health* 14, 46.
Eladak, S., Grisin, T., Moison, D. et al. (2015). *Fertil Steril* 103, 0015-0282.
Stoner, M. A., Yang, C. H. Z. and Bittner, G. D. (2014). *Toxicol In Vitro* 28, 916-925.

SCREENING OF ENDOCRINE DISRUPTORS AND THEIR IMPACT ON HUMAN HEALTH



Dvořáková M.^{1,2}, Kejlová K.¹, Bendová H.¹, Rucki M.¹, Kohout P.¹, Tomešová J.³, Jírová D.^{1,2}

¹ National Institute of Public Health, Šrobárova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic
² Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic; ³ Thomayer Hospital, Vídeňská 800, 140 59 Prague 4, Czech Republic

INTRODUCTION

Endocrine disruptors are hormonally active substances of natural or synthetic origin, affecting the endocrine (hormonal) systems of humans. They have been associated with clinically observed adverse developmental, reproductive, neurological and immune effects which may appear in later periods of life after early developmental exposure. Endocrine disruptors comprise various chemicals, e.g. steroids, cyclic hydrocarbons, phenols, flavonoids, phthalates, parabens, biocides, plasticizers, surfactants, fire retardants, distinct antimicrobials, UV filters, toxic metals and other substances. Endocrine-disrupting chemicals are found in environmental and biological samples, commercial and consumer products, food, food contact materials, and numerous other sources.

At the international level, improvement of testing strategies and methods is highly required and has been discussed in the context of EU and global legislation. Analogues to already regulated bisphenol A are also suspected to exhibit endocrine disrupting effects. We have used two available in vitro methods suitable for detection of endocrine activity of these chemicals on human estrogen and androgen receptors.

MATERIALS AND METHODS

- Chemicals analogous to bisphenol A (BPA), i.e. BPA6 BPE BPS, BPZ, BPF, BPAP (Sigma Aldrich) were tested in a pilot study for endocrine activity, comparing to BPA and relevant analytical standards (Methoxychlor, 17 β -estradiol, Sigma Aldrich). Chemical structure of the tested compounds is indicated in Table 1.
- In silico approach utilizing OECD QSAR Toolbox was used for prediction of potential ligands and their binding affinity to the estrogen receptor α (ER α) based on the chemical structure, molecular weight and partition coefficient octanol-water of the screened compounds. OECD QSAR Toolbox, v. 3.3.2, database allows to categorize the screened compounds according to their binding affinity into groups, e.g. very strong binder, binder, non binder, as indicated in Table 2.
- A continuous human cell line VM7Luc4E2 with endogenous ER α , suitable for luciferase reporter gene assay (Estrogen Receptor Transactivation Assay (ER TA), OECD TG 457), was kindly provided by Prof. Michael Denison, UC Davis, California, USA, for research purposes (Fig. 1). The functional assay is based on binding of a tested substance to ER α . Luciferase Assay System (Promega) in combination with Promega Injector Luminometer was used as the measure of the ER α receptor activation by the tested substances (Fig. 2, 3).
- A commercially available yeast-based microplate assay (Xenoscreen YES/YAS, Xenometrix[®], Switzerland) designed for detection of estrogenic and androgenic agonistic/antagonistic activities of chemicals and water samples, using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains with human estrogen (hER α) and androgen (hAR) receptors, was used as a comparative test to ER TA (OECD TG 457) method. The assay was performed according to the provided standard operating procedure, using the supplied standardized material and chemicals. The OD of the red product resulting from conversion of the yellow substrate after secretion of β -galactosidase was measured on Biotec Eon[™] High Performance Microplate Spectrophotometer at 570 nm. The OD₅₇₀ of the end product in comparison with controls provides direct correlation with the endocrine activity of the tested substances (Fig. 4-7).

CONCLUSIONS

- In silico results obtained with the use of OECD QSAR Toolbox predicted all the screened compounds as very strong binders of estrogen receptor α .
- In both in vitro bioanalytical tests, BPA and all tested analogues showed similar estrogenic activity comparing to 17 β -estradiol (Fig. 2, 3, 4).
- BPZ and BPF showed a potential of even higher estrogenic activity comparing to BPA in both in vitro assays (Fig. 2, 4).
- Significant antagonistic activity to human ER α was not clearly confirmed for any of the tested compounds comparing to 4-hydroxytamoxifen used as a positive control (Fig. 5).
- BPZ showed weak agonistic activity to human androgen receptor while BPA and BPF were not identified as agonists of human androgen receptor in the yeast reporter gene assay comparing to 5 α -dihydrotestosterone as a positive control (Fig. 6).
- BPA and BPF showed a potential of antagonistic activity to human androgen receptor comparing to flutamide as a positive control in the yeast reporter gene assay (Fig. 7).
- New chemicals being developed as replacement of compounds already confirmed and regulated as endocrine disruptors (e.g. BPA) should be the subject of thorough evaluation to avoid their contribution to adverse health effects caused by exposure from multiple sources.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (National Institute of Public Health – NIPH, IN: 75010330).

Table 1. Chemical structure of tested bisphenols

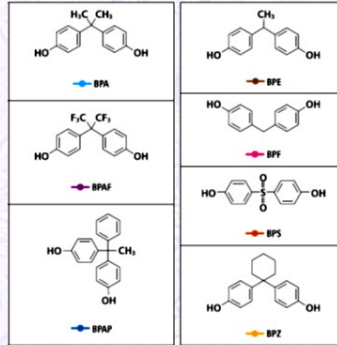


Fig. 1. VM7Luc4E2 cell line, magnification 200x



Fig. 2. Estrogenic activity of BPA and analogues in ER TA assay, OECD TG 457 (LUC gene expression)

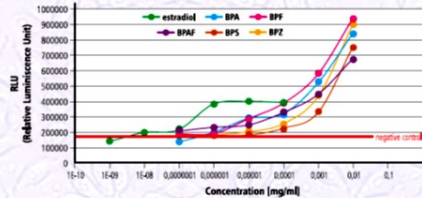


Fig. 3. Estrogenic activity of BPA analogues in ER TA assay, OECD TG 457 (LUC gene expression)

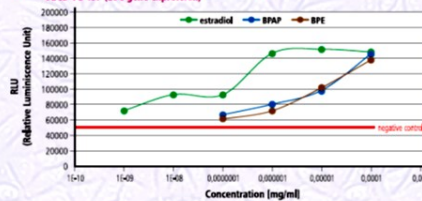


Table 2. Prediction of potential binding affinity on human ER α of selected bisphenol A analogues using the OECD QSAR Toolbox

Compound	CAS No.	ER α binding affinity
BPA	80-05-7	Very strong
BPAF	1478-61-1	Very strong
BPAP	1571-75-1	Very strong
BPE	2081-08-5	Very strong
BPF	620-92-8	Very strong
BPS	80-09-2	Very strong
BPZ	843-55-0	Very strong

Fig. 4. Agonistic activity to human estrogen receptor α in Xenoscreen[®] YES assay (β -galactosidase gene expression)

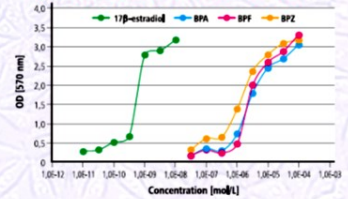


Fig. 5. Antagonistic activity to human estrogen receptor α in Xenoscreen[®] YES assay (β -galactosidase gene expression)

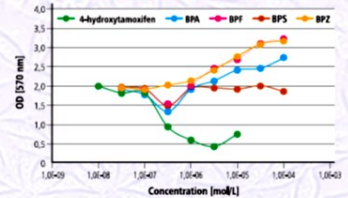


Fig. 6. Agonistic activity to human androgen receptor in Xenoscreen[®] YAS assay (β -galactosidase gene expression)

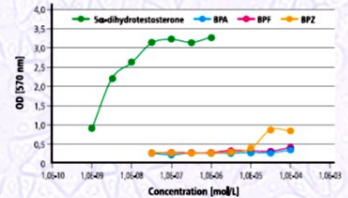
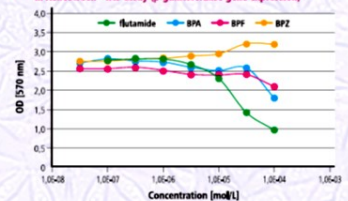


Fig. 7. Antagonistic activity to human androgen receptor in Xenoscreen[®] YAS assay (β -galactosidase gene expression)





Endocrine system

P-04-11-01 Validity of T₃, T₄ and TSH hormone measurement and stepwise evaluation in juvenile rats based on OECD TG's 422/421



Heike Marxfeld, Volker Strauss, Sibylle Groeters, Steffen Schneider, Bennard van Ravenzwaay

BASF SE, Ludwigshafen, Germany

Introduction: With the release of the new OECD TG's 421/422 and the OECD TG 443 the validity of thyroid hormone measurements in juvenile rats with commercially available test kits is re-discussed.

Material and methods: We validated ELISA kits for measurement of T₃ and T₄ in rats and compared them regarding precision and functional sensitivity with established radioimmunoassays (RIA). We measured T₃, T₄ and TSH in PND4 and PND22 pups of two mechanistic studies and the latter two hormones in pups of the same age of additional four OECD TG 443 studies. T₄ – and in single studies additional TSH – were measured in PND4 and PND13 pups of 17 OECD TG 421/422 studies.

Results: Inter-individual variation of hormone values in control groups were assessed and the statistical power was calculated. These parameters were compared with corresponding values observed in adult rats. In pups until PND22 no sex-specific differences of the thyroid hormone levels occurred. A T₃ level decrease in juvenile rats could hardly be detected with commercial ELISA and RIA kits due to the assay sensitivity.

Conclusion: In consideration of the results, an algorithm for a stepwise measurement of thyroid hormones in rats in the frame of the OECD TG 421/422 including thyroid weight and histopathological findings was proposed in order to follow a scientific-based, stepwise investigation of various cohorts in this study type.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.463>

P-04-11-02 Identification of endocrine disruptors using alternative methods



Markéta Dvořáková^{1,2}, Kristina Kejllová¹, Hana Bendová¹, Marian Rucki¹, Adam Vavrouš¹, Dagmar Jirová¹

¹ Centre of Toxicology and Health Safety, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

² Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

0378–4274/

Endocrine disrupting substances are found in environmental samples (e.g. surface water, sewage sludge, sediments, domestic waste, outdoor and indoor air) and even in human biological samples (e.g. blood, urine, adipose tissue). It is a specific group of compounds, which may be ligands of human estrogen or androgen receptors due to their molecular weight and structure, and thus, depending on the degree and frequency of exposure, have the ability to affect endocrine system either by blocking or activating the receptor. Certain compounds with endocrine disrupting effects can be found in the chemical groups as steroids, cyclic hydrocarbons, phenols, flavonoids, phthalates, parabens, biocides, plasticizers, surfactants, fire retardants, antimicrobials, UV filters, or toxic metals. They have been associated with clinically observed adverse developmental, reproductive, neurological and immune effects. QSAR and *in vitro* transactivation assays were used for screening of certain analogues of bisphenol A, phthalates and novel antimicrobials. Presented results of the pilot study indicate a correlation of methods and detection of molecular interactions of certain compounds with human estrogen and androgen receptors. Chemicals developed as replacement of compounds already regulated as endocrine disruptors (e.g. bisphenol A) should be a subject of thorough evaluation to avoid their contribution to adverse health effects caused by exposure from multiple sources. The research was supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (National Institute of Public Health – NIPH, IN: 75010330) and by TE02000006 Centre for alternative environment friendly high effective polymer antimicrobial agents for industrial applications (ALTERBIO).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.464>

P-04-11-03 OECD 443 extended one generation reproduction toxicity study: Some important considerations relating to study conduct



David Myers, Steven Renaut

Envigo, Eye, United Kingdom

In February 2015 Regulation (EU) 2015/282 amending Reach annexes VIII, IX and X was signed, incorporating the OECD 443 study as the preferred study for reproductive toxicology testing. Compared to its predecessor, the OECD 416 Two-generation study, the OECD 443 study evaluates a greater proportion of F1 offspring, assesses endocrine disruptor related endpoints, and can result in a reduction in animal use.

IDENTIFICATION OF POTENTIAL ENDOCRINE DISRUPTORS USING ALTERNATIVE METHODS ACCORDING TO 3R PRINCIPLES



Marketa Dvorakova¹, Kristina Kejlova², Hana Bendova², Marian Rucki², Adam Vavrouš², Dagmar Jirova²
¹ National Institute of Public Health, Šróbárova 48, 100 42 Prague 10, Czech Republic; ² Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruski 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic



INTRODUCTION

Endocrine disruptors (ED) have been associated with clinically observed adverse developmental, reproductive, neurological and immune effects. ED may act in extremely low nanomolar concentrations. Low doses of ED may have additive or synergistic effects, similarly to endogenous hormones that often activate or inhibit the receptor by very small concentration changes.

General population is exposed to hundreds of compounds. Extremely low concentrations of the individual components of mixtures and chronic exposure may result in complex adverse effects on the endocrine system. ED may be released from products intended for consumers, e.g. cosmetics or toys, everyday items, household products, medical devices, food packaging materials and other products coming from industry or agriculture. The exposure to the compounds with potential of endocrine activity cannot be simply investigated in humans since it is influenced by many individual environmental, medical and social factors. *In vitro* methods, with respect to 3R principles are therefore essential to be developed and used to monitor endocrine disruption. Increasing pressure on testing of endocrine disruption potential *in vitro* without the use of animals is anticipated, along with eminent efforts to reduce the exposure of humans, particularly of sensitive populations.

MATERIAL AND METHODS

- OECD QSAR Toolbox was used for prediction of potential ligands and their binding affinity to the estrogen receptor α (ER α) based on chemical structure, molecular weight and partition coefficient octanol-water.
- Selected analogues of bisphenol A (BPA) and selected phthalates (Sigma Aldrich) were tested in a continuous pilot study for endocrine activity, in comparison with relevant positive controls (17 β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, 5 α -dihydrotestosterone, flutamide). Chemical structure of the tested compounds is indicated in Table 1.
- A continuous human cell line VM7Luc4E2 (Fig. 1) developed and kindly provided for research purposes by Prof. Michael Denison, UC Davis, California, USA was used according to the OECD TG 455 for confirmation of OECD QSAR Toolbox prediction. Luciferase Assay System (Promega) in combination with Promega Injector Luminometer was used to measure the ER α receptor activation by the tested substance.
- Commercially available year-based microplate assay (DensScreen YES/YAS, Xenometra[®], Switzerland, see Fig. 2, 3 as example plates of the assay), designed for detection of compounds with estrogenic and androgenic agonistic/antagonistic activities, was performed according to the provided standard operating procedure, using the supplied standardized material and chemicals in order to study the interactions of the tested chemicals with human estrogen (ER) and androgen (AR) receptors. The OD of the red product resulting from conversion of the yellow substrate after secretion of β -galactosidase, indicating the endocrine activity of the tested substance, was measured on Biotec Eon[™] High Performance Microplate Spectrophotometer.

Fig. 1 • Human cell line VM7Luc4E2.



Fig. 2 • Example of ER α agonist assay, positive control: 17 β -estradiol.

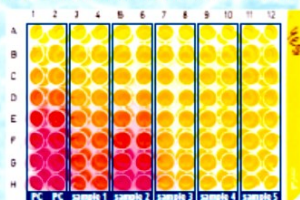
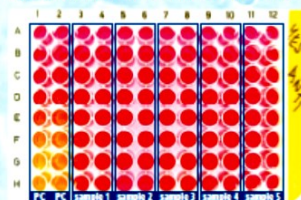


Fig. 3 • Example of ER α antagonist assay, positive control: 4-hydroxytamoxifen.



RESULTS

Results of OECD QSAR Toolbox prediction, OECD TG 455 and YES/YAS assay are indicated in Table 2.

- +++ result of OECD QSAR Toolbox indicates a very strong binder.
- +++ result of *in vitro* methods indicates that the substance showed a concentration-response curve consisting of a baseline, followed by a slope concluding in a plateau or peak, while the difference between the baseline and peak was at least 70 % of the maximal value for the positive control.
- ++ result of *in vitro* methods indicates that the substance showed a concentration-response curve consisting of a baseline, followed by a slope concluding in a plateau or peak, while the difference between the baseline and peak was at least 40 % of the maximal value for the positive control.
- + result of *in vitro* methods indicates that the substance showed a response consisting of a baseline, followed by a slope or peak, and the difference between the baseline and peak was at least 20 % of the maximal value for the positive control.
- N result of OECD QSAR Toolbox indicates a non binder.
- N result of *in vitro* methods indicates that the substance did not show a response consisting of a baseline, a slope or peak with the difference between the baseline and peak at least 20 % of the maximal value for the positive control.

CONCLUSIONS

- In silico* results obtained with the use of OECD QSAR Toolbox predicted all the screened phthalates as non binders and all the screened bisphenols as very strong binders on estrogen receptor α . Regarding the androgen receptor, a scientifically valid QSAR Toolbox is not available yet.
- OECD QSAR Toolbox turned out to be a good starting point for prediction of substances with possible estrogenic effects based on their chemical structure.
- For human relevant testing, the development and use of methods based on biological systems expressing both estrogen and androgen target human receptors remains inevitable.
- Both *in vitro* biological methods exhibited good concordance of results regarding the estrogenic agonistic activity considering minor discrepancies due to cytotoxicity elicited in higher concentrations. Cytotoxicity was observed after 48h exposure of S. cerevisiae cells to concentrations at 3.6×10^{-5} mol/l, suggesting their potential antimicrobial effect.
- Substances showing negative estrogenic activity may exhibit activity on the androgen receptors.
- New chemicals being developed as replacement of compounds already confirmed and regulated as endocrine disruptors (e.g. BPA) should be the subject of thorough evaluation to avoid their contribution to adverse health effects caused by exposure from multiple sources.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (National Institute of Public Health – NIPH, IN: 75010330).

Table 1 • Chemical structure of tested compounds.

COMPOUND	CAS NO.	M.W.	CHEMICAL FORMULA	STRUCTURAL FORMULA
Diethyl phthalate (DEP)	84-66-2	222.24	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	
Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	117-81-7	390.56	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	
Benzyl butyl phthalate (BBP)	85-68-7	312.36	2-(C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂ O ₂ C)C ₄ H ₉	
Dibutyl phthalate (DBP)	84-74-2	278.34	C ₁₆ H ₁₄ (CO ₂ (CH ₂) ₄) ₂	
Dibutylbutyl phthalate (DBBP)	84-69-5	278.34	C ₁₆ H ₁₄ (1,2-CO ₂ (CH ₂) ₄ CH(CH ₂) ₃) ₂	
Dibutylmethyl phthalate (DINP)	28553-12-0	418.61	C ₁₆ H ₁₄ (CO ₂ (C ₆ H ₁₃)) ₂	
Dibutyldecyl phthalate (DIDP)	26761-40-0	446.66	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	
Bisphenol BP (BFBP)	1844-01-5	352.43	C ₂₅ H ₂₆ O ₂	
Bisphenol C (BPC)	79-97-0	256.34	(CH ₃) ₂ C(C ₆ H ₄ (CH ₂ OH)) ₂	
Bisphenol FL (BFL)	3236-71-3	350.41	C ₂₅ H ₂₆ O ₂	
Bisphenol G (BPG)	127-54-8	350.41	C ₂₁ H ₂₂ O ₂	
Bisphenol M (BPM)	13595-25-0	346.46	C ₁₆ H ₁₄ (C(CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ OH) ₂	
Bisphenol P (BPP)	2167-51-3	346.46	C ₁₆ H ₁₄ (C(CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ OH) ₂	
Bisphenol TMC (BP TMC)	129188-99-4	310.43	C ₂₁ H ₂₂ O ₂	

Table 2 • Endocrine activity of tested compounds.

COMPOUND	ER BINDING (QSAR)	ER AGONIST (OECD 455)	ER AGONIST (YES/YAS)	ER ANTAGONIST (YES/YAS)	AR AGONIST (YES/YAS)	AR ANTAGONIST (YES/YAS)
Diethyl phthalate (DEP)	N	N	N	N	N	N
Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	N	N	N	N	N	N
Benzyl butyl phthalate (BBP)	N	++	+	N	N	+
Dibutyl phthalate (DBP)	N	N	N	N	N	+
Dibutylbutyl phthalate (DBBP)	N	N	N	N	N	+
Dibutylmethyl phthalate (DINP)	N	N	N	N	N	N
Dibutyldecyl phthalate (DIDP)	N	N	N	N	N	N
Bisphenol BP (BFBP)	+++	N	N	++	N	++
Bisphenol C (BPC)	+++	+++	+++	N	N	+++
Bisphenol FL (BFL)	+++	N	++	N*	+	N*
Bisphenol G (BPG)	+++	+	++	+++	N*	+
Bisphenol M (BPM)	+++	++	++	+++	N*	+++
Bisphenol P (BPP)	+++	++	N	++	N	++
Bisphenol TMC (BP TMC)	+++	+++	+++	N	N	+++

*In the highest possible tested concentration: 10⁻⁵ mol/l



Innovative Models for Safety and Efficacy – Models of Developmental and Reproductive Biology

III-122

Identification of potential endocrine disruptors using alternative methods according to 3R principles

Marketa Dvorakova^{1,2}, *Kristina Kejlova*¹, *Hana Bendova*¹,
*Marian Rucki*¹, *Adam Vavrous*¹ and *Dagmar Jirova*¹

¹Centre of Toxicology and Health Safety, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; ²Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic
marketa.dvorakova@szu.cz

Endocrine disrupting substances comprise various chemicals (e.g. cyclic hydrocarbons, phenols, flavonoids, phthalates, biocides, plasticizers, surfactants, fire retardants, antimicrobials, UV filters, etc.) and are found in biological samples, consumer products, food, plastics, food contact materials, etc. *In silico* and *in vitro* screening methods were used for identification of endocrine disruption potential of certain analogues of bisphenol A, phthalates and novel antimicrobials. Presented results indicate a correlation of methods and detection of molecular interactions of certain compounds on human estrogen and androgen receptors. New chemicals being developed as replacement of compounds already regulated as endocrine disruptors should be a subject of thorough evaluation to avoid their contribution to adverse health effects. Alternative methods based on human cells and tissues are promising tools for identification of endocrine disruption in terms of systemic toxicity.

Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (National Institute of Public Health – NIPH, IN: 75010330).

References

- Dvorakova, M., Kejlova, K., Bendova, H. et al. (2016). Alternative methods *in vitro* for screening of endocrine disruptors. *Neuroendocrinol Lett* 37, Suppl 1, 123-131.
- Goldinger, D. M., Demierre, A. L., Zoller, O. et al. (2015). Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland. *Regul Toxicol Pharmacol* 71, 453-462.
- Liao, C., Liu, F. and Kannan, K. (2012a). Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environ Sci Technol* 46, 6515-6522.
- Molina-Molina, J. M., Amaya, E., Grimaldi, M. et al. (2013). *In vitro* study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 272, 127-136.
- Rogers, J. M. and Derison, M. S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: Development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and antiestrogenic chemicals. *In Vitro Mol Toxicol* 13, 67-82.

III-184

Quantitative image-based assessment of morphological features in zebrafish to improve developmental toxicity assessment

*Elisabet Teixido*¹, *Tobias Kiepling*^{1,2} and *Stefan Scholz*¹

¹Department of Bioanalytical Ecotoxicology, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ, Leipzig, Germany; ²Scientific Software Solutions, Leipzig, Germany
elisabet.teixido@ufz.de

Developmental toxicological studies are usually required in both a rodent and a non-rodent species. Testing in a second species will not be waived until it is demonstrated that other approaches would reveal the same level of information on potential developmental toxicity. Zebrafish has become a key alternative model but efforts are needed to improve its performance. Hence, an automated image-based quantification of morphological features in toxicant-treated zebrafish embryos was developed. Images of zebrafish larvae were collected using the VAST Bioimager to handle and properly orient embryos. To detect the morphological features a standalone software named Fish-Inspector was developed based on MATLAB scripts. For each endpoint concentration-response curves were derived to rank the toxicity, cluster responses and potentially derive diagnostic signatures. Some of the substances displayed a high toxic ratio, suggesting a specific interaction with embryonic development. In some cases, quantitative endpoints were more sensitive than cumulative manual analysis. This approach contributes to understand the predictive capacity of the zebrafish embryo assays and strategies to improve it.

III-374

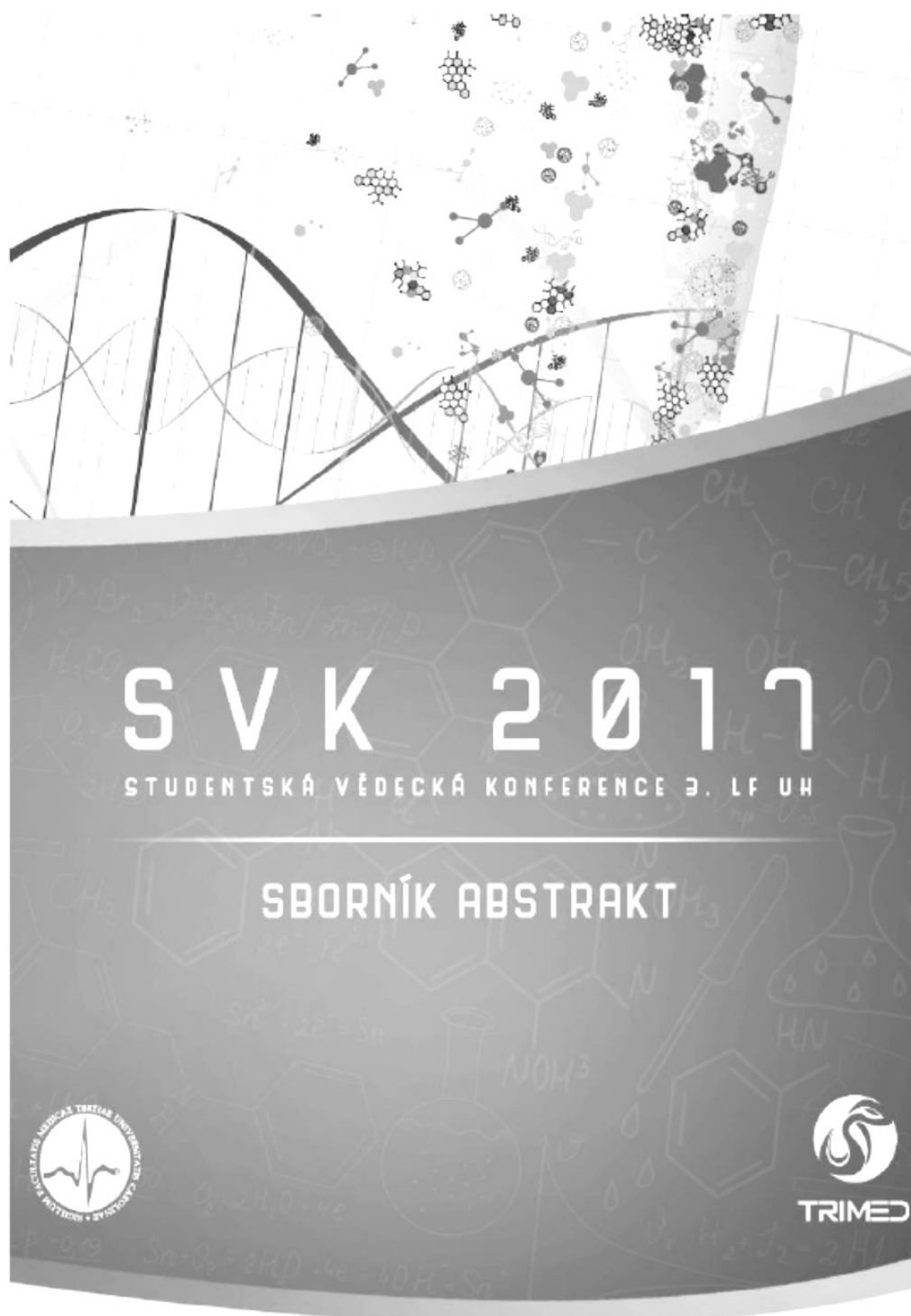
The role of ABCG2 in mouse embryonic stem cell development

*Maria Hoopes*¹, *Mitch Rosen*¹, *Kelly Chandler*²,
*S. Charla*¹, *Harriette Nichols*¹ and *Edward S. Hunter III*¹

¹ORD/ISTD/SBB, US EPA, Research Triangle Park, NC, United States; ²Office of Policy, Planning, and Evaluation, NIEHS, Research Triangle Park, NC, United States
Hoopes.Maria@epa.gov

ABCG2 is a commonly studied efflux transporter. The role of ABCG2 during early development, however, is not clear. Previous studies suggested that regulation of ABCG2 could be associated with altered differentiation in mouse embryonic stem cells (mESC) via altered redox status. ABCG2 activity was found to expand during early mESC differentiation. Pharmacological inhibition of ABCG2 was used, with and without xenobiotic exposure, to evaluate differentiation. Inhibition of ABCG2 in combination with chemicals predicted by ToxCast to regulate ABCG2 did not modify toxicity. Moreover, while inhibition of ABCG2 increased the toxicity of certain chemotherapeutics, it did not shift the toxicity of oxidative stressors. Hence, ABCG2 serves a protective role during development, although its role in regulating redox status is unclear. The hypothesis that regulation of ABCG2 by xenobiotics may be related to altered differentiation could not be supported.

This abstract does not reflect EPA policy.



SLEDOVÁNÍ VLIVU ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ NA ZDRAVÍ ČLOVĚKA

**Mgr. Markéta Dvořáková, RNDr. Kristina Kejlová, Ph.D.,
RNDr. Marian Rucki, Ph.D., RNDr. Hana Bendová, Ph.D.**

Vedoucí práce: MUDr. Dagmar Jírová

Státní zdravotní ústav

Úvod:

Endokrinní disruptory (ED) jsou hormonálně aktivní látky, spojované s negativními klinickými účinky, např. na reprodukci a vývoj. Mohou interagovat s mnoha buněčnými receptory a tak ovlivňovat endokrinní systém. Další reakce se mohou vyskytnout po transformaci těchto látek na metabolity. Toxikologické studie dokládají, že ED působí nemonotónně, v nízkých koncentracích, jako endogenní hormony. Lidský organismus může být vystaven směsí různých látek, jejich synergickým, aditivním účinkům a efektu společného působení. Předpokládá se narůstající expozice i nárůst patofyziologických důsledků na lidské zdraví. Nejsou však dostatečně objasněny cesty expozice a interakce s lidským organismem. Pomocí nových toxikologických metod lze včas identifikovat potenciál endokrinní disruptivity látek se zdravotním rizikem.

Cíl:

Sledovat potenciál endokrinní disruptivity vybraných látek, používaných ve výrobních procesech nebo tvořících součást spotřebních výrobků a obalů.

Metodika:

Pomocí OECD QSAR Toolbox byly na základě strukturních a vazebných charakteristik určeny předpokládané interakce bisfenolu A (BPA) a analogů BPAF, BPF, BPS, BPZ, BPE, BPAP s estrogenním receptorem α (ER α). *In silico* data byla ověřována pomocí nových toxikologických metod *in vitro* založených na geneticky modifikovaných kmenech *S. cerevisiae* a kolorimetrické detekci. Inhibice relativní odpovědi na referenční agonistickou látku je znakem antagonistické aktivity. Metoda detekuje interakce s ER α , androgenním receptorem (AR) i cytotoxický efekt. Alternativou je zkouška s využitím rekombinantní

lidské buněčné linie karcinomu prsu VM7Luc4E2, exprimující endogenní estrogení receptory α a v menší míře β . Koncovým bodem je měření chemiluminiscence.

Výsledky:

Analogy BPA byly vyhodnoceny *in silico* jako velmi silné ligandy ER α . V *in vitro* zkouškách vykazovaly všechny testované analogy podobnou estrogení aktivitu v porovnání s 17- β estradiolem a BPA. Významná antagonistická aktivita na ER α nebyla jednoznačně potvrzena. BPZ vykazoval slabou agonistickou aktivitu na AR. BPA a BPF vykazovaly potenciál antagonistických účinků na AR.

Závěr:

Nové látky, vyvíjené jako náhrada sloučenin, u nichž byla potvrzena endokrinní aktivita a jsou již legislativně regulovány (např. BPA), by měly být předmětem toxikologických studií, aby bylo včasnou identifikací jejich vlastností sníženo zdravotní riziko v důsledku expozice z více zdrojů.

Podpora: Podpořeno MZČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZÚ).