

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta



Autoreferát disertační práce

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

Mgr. Markéta Dvořáková

2019

Školitel: MUDr. Dagmar Jírová, CSc.

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady:

Preventivní medicína, doc. MUDr. Alexander M. Čelko, CSc.

Školící pracoviště:

Státní zdravotní ústav, Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti

Autor:

Mgr. Markéta Dvořáková

Školitel:

MUDr. Dagmar Jírová, CSc.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne:

S dizertací je možno se seznámit na děkanátu 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Obsah	3
Souhrn	4
Summary	4
1. Úvod	5
2. Hypotézy a cíle práce	6
3. Metodika	7
4. Výsledky	10
5. Diskuse	18
6. Závěr	25
7. Seznam literárních zdrojů	27
8. Seznam internetových zdrojů	39
9. Seznam publikací doktoranda	39

Souhrn

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.

Summary

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 intervention 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.

1. Úvod

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). 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 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 (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. Kromě preventivního poradenství a preventivních intervenčních opatření s cílem chránit zdraví spotřebitele je klíčovou aktivitou přenos výsledků biomedicínského výzkumu do klinické praxe a následný osvětený přístup erudovaných praktických lékařů, odborně způsobilých poskytovat preventivní poradenství. 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. Výsledky z biomedicínského výzkumu a biologického monitorování jsou velmi cennými a často unikátními daty, na základě kterých lze navrhovat 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.

2. Hypotézy a cíle práce

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. 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.
2. 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.
5. 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.

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.

Primárním cílem bylo zavedení efektivních *in vitro* metod 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.

Dalším cílem bylo ověření využitelnosti zavedených metod i pro stanovení nebezpečných vlastností (endokrinní disrupce) u vybraných spotřebních výrobků a jejich ingrediencí a optimalizace pro co nejširší využití na různém typu vzorků.

Dalším cílem bylo ověření prediktivních indikátorů zvýšené expozice ED u člověka. Na základě nejčastěji detekovaných metabolitů chemických látek bylo třeba stanovit vhodné prediktivní indikátory zvýšené expozice.

Doplňkovým cílem, bylo ověření hypotézy, že expozice ED je kontinuální a dietární expozice je relevantním faktorem ovlivňujícím celkovou expozici člověka ED, 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.

Závěrečným cílem 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.

3. Metodika

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). Pro predikci jsou využívány základní strukturální 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 atomů 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 atomů uhlíku v benzenovém jádře a neomezeným počtem hydroxylových nebo amino- skupin jsou predikovány jako slabé ligandy. Pokud chemická látka nespĺňuje základní strukturální a parametrické ukazatele, je predikována jako nevázájící se na estrogenový receptor (např. látky s vyšší molekulovou hmotností než 500 Da, látky postrádající hydroxylové nebo amino- skupiny, postrádající cyklickou strukturu jádra, atd.).

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).

Identifikace estrogenního potenciálu metodou *in vitro* pomocí metod založených na *S. cerevisiae* (YES, anti-YES, YAS, anti-YAS)

Pro identifikaci a potvrzení estrogenního (agonistického) potenciálu byla využita nově zavedená *in vitro* zkouška založená na geneticky modifikovaném kmenu (YES) kvasinek *S. cerevisiae*. 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).

Metodika je shodná pro všechny dále uvedené 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 mikrodestičce po dobu 48 h při 31 °C a jemném třepání na orbitální třepačce v přítomnosti substrátu pro enzym β -galaktozidázu. 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.

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

Pro identifikaci anti-estrogenního (antagonistického) potenciálu byla využita *in vitro* metoda založená na geneticky modifikovaném kmenu (YES) kvasinek *S. cerevisiae*. Pro detekci anti-estrogenní aktivity je do média přidán standardní přídavek silného ligandu (17 β -estradiol [E2; CAS 50-28-2] ve finální koncentraci 1 x 10⁻⁹ mol/l), přičemž metoda detekuje kompetitivní inhibici vazby standardního přídavku (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]).

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

Pro identifikaci androgenního (agonistického) potenciálu byla využita nově zavedená *in vitro* zkouška založená na geneticky modifikovaném kmenu (YAS) kvasinek *S. cerevisiae*. 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). Jako pozitivní kontrola byl použit 5 α -dihydrotestosteron [DHT; CAS 521-18-6].

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

Pro identifikaci anti-estrogenního (antagonistického) potenciálu byla využita *in vitro* metoda založená na geneticky modifikovaném kmenu (YAS) kvasinek *S. cerevisiae* (identickým jako u předchozí metody popsané v odstavci 6.5.). Pro detekci anti-androgenní aktivity je do média přidán standardní přídavek silného ligandu (5 α -dihydrotestosteron [DHT; CAS 521-18-6] ve finální koncentraci 3 x 10⁻⁸ mol/l), přičemž metoda detekuje kompetitivní inhibici vazby standardního přídavku (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]).

Modifikace metod založených na *S. 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.

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. Pro stanovení potenciálu endokrinní disrupce (agonistické i antagonistické aktivity vůči estrogenovému i androgenovému receptoru) byly využity tyto metody: 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).

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. 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 popisné statistické ukazatele (četnost, aritmetický průměr, geometrický průměr, medián, percentil 95, 75, 50, 25 a nejvyšší hodnota). Výsledky byly vyneseny do grafů a na základě zhodnocení četnosti detekce byly stanoveny potenciální prediktivní indikátory zvýšené expozice endokrinním disruptorům. Pro základní popisné statistické vyhodnocení 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.

Porovnání efektivity intervenčních opatření pro potenciální snížení expozice bisfenolům a ftalátům

Studie byla navržena jako doplňková a její potenciální přínos vyplynul z rešeršní 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 ve vhodném 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). 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.

Fáze I probíhala v listopadu 2017. Požadovala stravu zaměřenou na konzervované potraviny (min. 2 ks za den dle vlastního výběru), a nápoje v plechovkách (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.

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. Návrh byl zpracován 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).

4. Výsledky

Dosažené výsledky jsou popsány jak v disertační práci, tak v publikacích, které jsou její součástí (Dvořáková et al. 2016, Dvořáková et al. 2018, Kejlová et al. 2019).

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 *S. 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 . Metody YES a YAS se 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. Pro 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.

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 1.

Č.	Látka	Zkratka	CAS	MW	Sumární vzorec	Vazba na ER
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 1. Výsledky predikce estrogenní aktivity pomocí OECD QSAR Toolbox.

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. 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). Některé bisfenoly (např. BPA, BPC, BPP, BPTMC) mohou fungovat jako ligandy estrogenového receptoru ve velmi nízkých koncentracích (od 10^{-8} mg/ml). 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. 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). 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.

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

Kromě agonistické aktivity vůči ER α zjištěné metodou dle OECD TG 455, kdy u všech bisfenolů s výjimkou BPFL byla zjištěna různě silná estrogenní aktivita, byla pomocí metody YES tato estrogenní aktivita potvrzena s výjimkou BPBP při testování metodou YES. Slabá agonistická aktivita vůči AR byla zjištěna pomocí metody YAS u BPFL a BPZ. U více látek ze skupiny bisfenolů byla pozorována střední až slabá antagonistická aktivita vůči ER α . U všech bisfenolů byla zjištěna slabá, střední až silná antagonistická aktivita vůči AR. U látek ze skupiny ftalátů byla pomocí metody YES potvrzena estrogenní aktivita u BBP. V metodě anti YES vykazoval antiestrogenní aktivitu DBP. Pomocí metody anti YAS byla u ftalátů DEHP, BBP, DBP, DIBP zjištěna slabá antagonistická aktivita vůči AR. Žádná látka ze skupiny ftalátů nevykazovala agonistickou aktivitu vůči AR (viz tabulka 2).

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	+++	+++	+++	+	N	++
Bisfenol AF	+++	+++	+++	+	N	+
Bisfenol AP	+++	++	+	++	N	+
Bisfenol BP (BPBP)	+++	+	N	+	N	++
Bisfenol C (BPC)	+++	++	+++	N	N	+++
Bisfenol E	+++	++	+	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 2. Potenciál endokrinní disrupce látek ze skupiny bisfenolů a ftalátů.

Legenda k tabulce 2:

*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.

ER: estrogenový receptor

AR: androgenový receptor

Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi papíru

Vzorky s bílým, žlutým, červeným a modrým potiskem vykazovaly negativní agonistickou aktivitu vůči estrogenovému i androgenovému receptoru. Vzorek papíru s černým potiskem A (black print) vykazoval agonistickou aktivitu vůči androgenovému receptoru. Dále byly detekovány časté slabé antagonistické interakce. Navíc, v antagonistických studiích (anti YES, anti YAS) byly zjištěny zvýšené hodnoty OD570 a vyšší indukční poměry, indikující možné potencující účinky vzorků vedoucí k zesílení vazby silných ligandů (standardního přídatku v definované koncentraci) na příslušný receptor, ve srovnání s hodnotami negativní kontroly.

Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u extraktů spotřebních výrobků na bázi plastu

Vzorek vyrobený z plastu ABS červené barvy ("Kegel balls red"; Venušiny kuličky - červená) vykazoval antagonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α a androgenovému receptoru. Ostatní vzorky vykazovaly negativní odpověď.

Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u kosmetických přípravků různého složení

Vzorky kosmetických přípravků různého složení vykazovaly antagonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α a androgenovému receptoru. Slabá agonistická aktivita v jedné koncentraci byla zjištěna u vzorku 6 (parfémovaná voda) vůči estrogenovému receptoru α (viz tabulka 3.)

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 3. Potenciální endokrinní aktivita vzorků kosmetických přípravků – shrnutí.

Stanovení potenciálu endokrinní disrupce u doplňků stravy

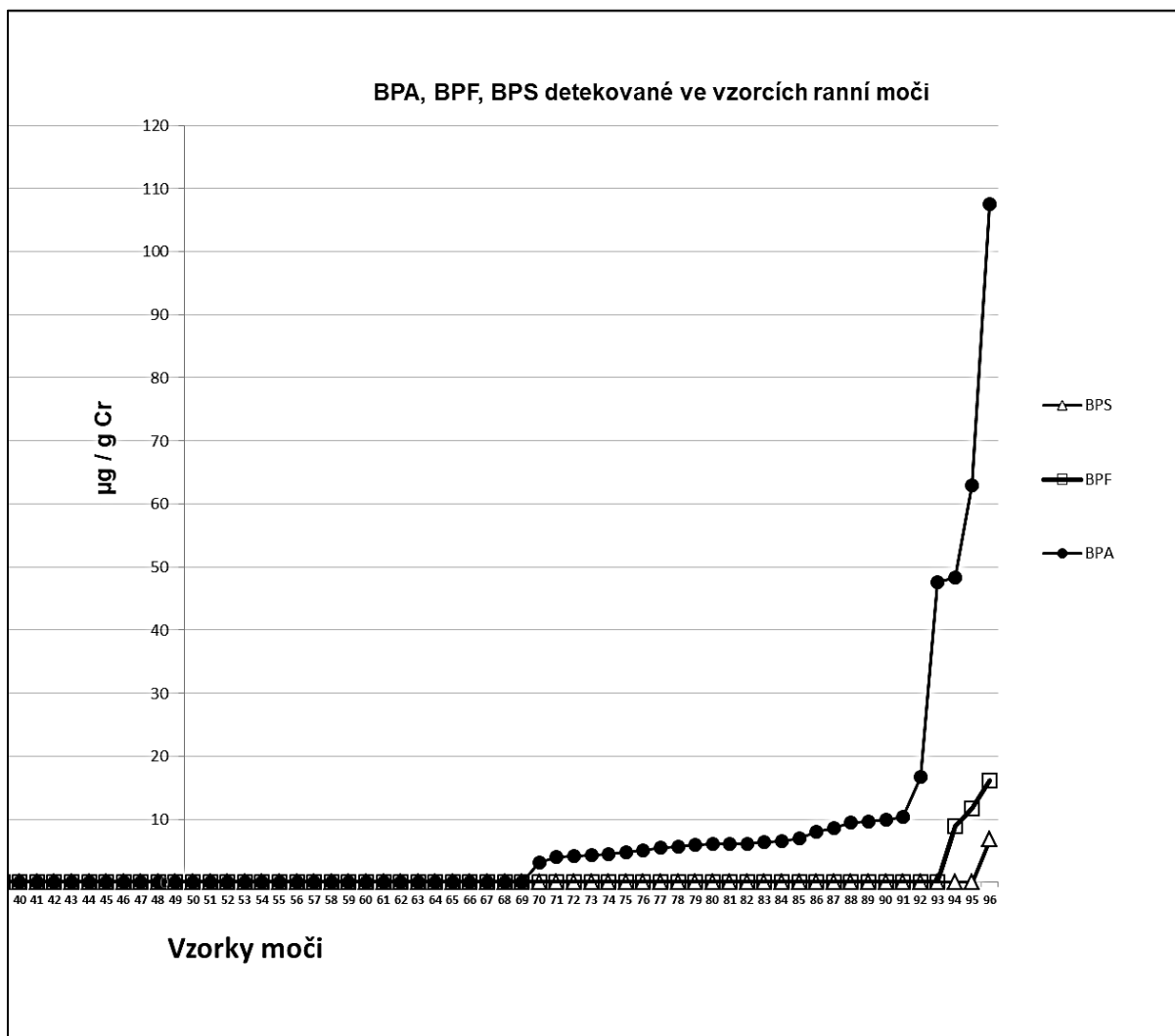
Vzorky 3 a 6 vykazovaly silnou agonistickou aktivitu vůči estrogenovému receptoru α , u vzorku 5 byla zjištěna velmi slabá agonistická aktivita (viz tabulka 4.)

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, Bigaradie – 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 větví, Kustovnice čínská – plod, Skořicovník čínský – kůra větví, Jam čínský – hlíza, Dřín lékařský – plod, Kokotice 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 červenokořenná – kořen; Kurkuma citvárová – oddenek; Křídlatka japonská – kořen a oddenek; Pivoňka bělokvětá – červený kořen; Toulec laločný – kořen, stonek; Zimolez japonský – stonek; Zevar výběžkatý – oddenek; Karbincec lesklý – nat; 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 větví; 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 větví).	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, všehož ženšenový.	NEGATIVNÍ

Tabulka 4. Potenciální endokrinní aktivita vzorků doplňků stravy – shrnutí.

Stanovení prediktivních indikátorů expozice bisfenolům

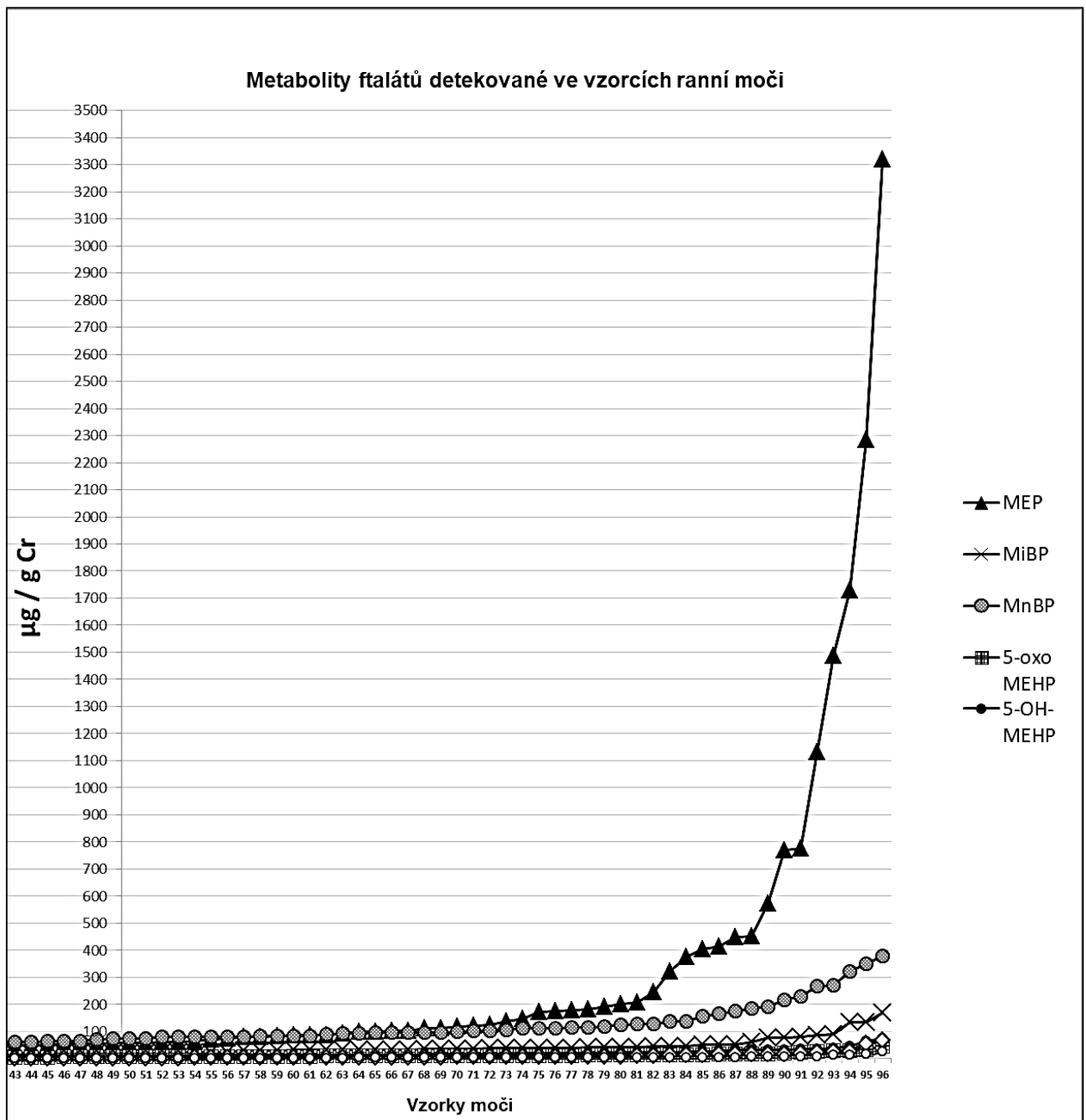
Analýzou 96 vzorků ranní moči byly zjištěny koncentrace BPA, BPF, BPS ($\mu\text{g/g}$ kreatininu). Ojedinele byly zjištěny nízké koncentrace u BPF (3 vzorky) a BPS (1 vzorek). Nejvyšší četnost pozitivních vzorků i nejvyšší koncentrace byly zjištěny u BPA (27 vzorků). Ve vzorcích 1 – 69 byly koncentrace bisfenolů nižší než byl limit kvantifikace analytické metody ($<\text{LOQ}$). Jako prediktivní indikátor expozice bisfenolům je možno využít BPA, vzhledem k ojedinelým nálezům BPF a BPS je však vhodné monitorovat i tyto analyty, z důvodu jejich možného využívání jako náhrad BPA.



Graf 3. Zjištěné koncentrace ($\mu\text{g/g}$ kreatininu) u bisfenolu A (BPA), bisfenolu S (BPS) a bisfenolu F (BPF) v 96 vzorcích ranní moči.

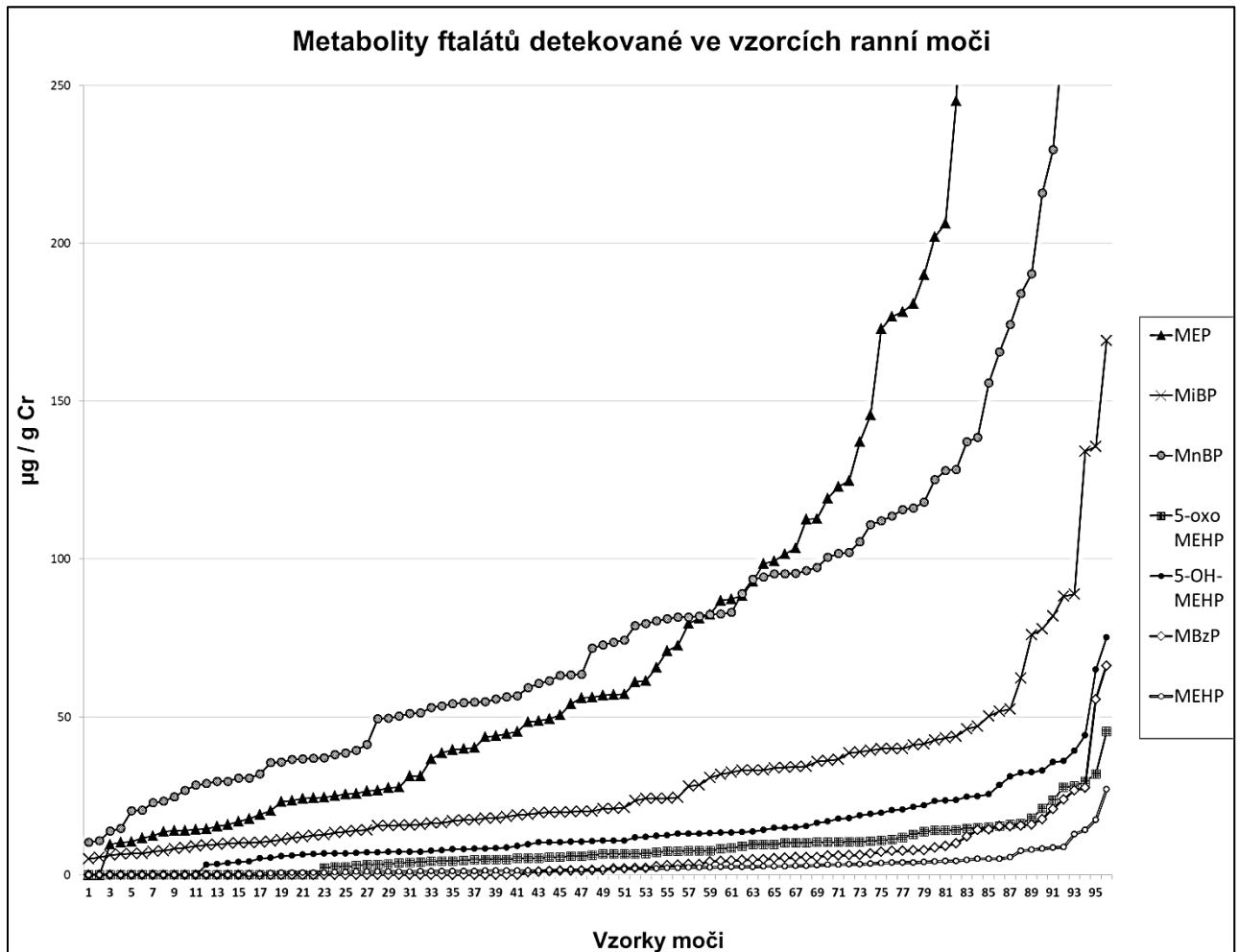
Stanovení prediktivních indikátorů expozice ftalátům

Analýzou 96 vzorků ranní moči byly zjištěny koncentrace metabolitů ftalátů ($\mu\text{g/g}$ kreatininu). Byla zjištěna vysoká četnost pozitivních vzorků. Velmi vysoké hodnoty byly zjištěny u MEP. Jako prediktivní indikátory expozice ftalátům je možno využít monoethyl ftalát (MEP), mono butyl ftalát (MnBP) a mono isobutyl ftalát (MiBP).



Graf 4. 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.

Detail grafu 4 (graf 5.): 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.



Graf 5. 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. Jako prediktivní indikátory expozice ftalátům lze využít MEP, MnBP a MiBP, které se vyskytovaly téměř ve všech vzorcích.

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). V tabulkách 6. a 7. 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 5. 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 6. Základní statistické ukazatele hodnot (FÁZE II).

Shrnutí výsledků:

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).

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).

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 nápojů v plechovkách
- 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.

5. Diskuse

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. 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. Expertní systém rtER ver.1 - profilátor USEPA, jehož data využívá OECD QSAR Toolbox, může 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. OECD QSAR Toolbox 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 . 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 nebo dat *in vivo* 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.

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 estrogení, anti-estrogení a anti-androgení aktivita (viz tabulka 2. 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). Odchylky 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.). 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 nebo variabilita v transportních mechanismech či přítomnost buněčné stěny u kvasinek) může docházet k drobným odchylkám, nicméně z výsledků (uvedených v tabulce 2.) vyplývá, že v rámci skupiny látek jsou nově zavedené *in vitro* metody spolehlivým nástrojem pro stanovení (ne)bezpečnosti za laboratorních podmínek. 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 zvýšit spolehlivost stanovení celkového potenciálu endokrinní disrupce. 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 s tím, že analogické látky ze skupiny bisfenolů nemusí být vhodnými náhradami BPA (Roelofs et al. 2015; Eladak et al. 2015, Molina-Molina et al. 2013, Liao et al. 2012; Liao & Kannan 2013; Liao & Kannan 2014).

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).

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. 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 1.). Příkladem, který potvrdil dobrou specifitu 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). 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. 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. 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. 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.

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 přežít 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, olejů alkoholu, glycerolu, methylesterů, mastných kyselin, olejů, některých stopových prvků (např. síry, hořčíku, zinku, mědi). 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 et al. 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.

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. 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 běžná populace může být exponována bisfenolu A cca z 30 % v nízkých koncentracích. Jako prediktivní indikátory expozice bisfenolům a ftalátům proto lze využívat metabolity ftalátů s nejčastější četností detekce, tj. MEP, MnBP, MiBP a BPA. 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 1g kreatininu ($\mu\text{g/g}$ Cr), neboť koncentraci látek v moči může ovlivnit to, jak je samotná odebraná moč koncentrovaná.

Stěžejní údaje o zátěži populace ČR ftaláty byly získány 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 či používáním spotřebních výrobků (např.

kosmetických přípravků v případě výskytu MEP v moči). Zjistili jsme taktéž, 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) $\mu\text{g/g Cr}$. Naše výsledky podporují nedávné závěry, že látky ze skupiny bisfenolů a ftalátů by měly být prioritizovány a zahrnuty do opakovaného sledování v rámci biomonitoringu (Černá et al. 2015). 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 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 navrhovat 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 pilotní studii na omezeném souboru dobrovolníků sledující efektivitu intervenčních opatření pro potenciální snížení expozice bisfenolům a ftalátům.

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, a to proto, že bisfenol A nebo jeho analogy 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). Přítomnost ftalátů ve stravě byla spojována se skladováním, migrací z obalů nebo kontaminací při produkci, přičemž na základě informací z některých studií, že ftaláty byly detekovány v olejích a tučných potravinách (Kappenstein et al. 2012), předpokládali jsme jejich možný obsah v tučnějších konzervovaných potravinách (např. rybích konzervách, paštikách, masových konzervách). Vzhledem k tomu, že konzervované výrobky obsahují často olej a tučné potraviny (např. ryby a maso), bylo u ftalátů taktéž uvažováno, že omezení příjmu vysoce zpracovaných konzervovaných potravin a nápojů v plechovkách by mohl být pozorován pokles jejich koncentrací 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. 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 5., 6.). 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 - 100,79 $\mu\text{g/g Cr}$ lze vysvětlit kontaminací z pracovního prostředí (účastník pracuje v chemické laboratoři). Dalším zajímavým výsledkem byla korelace hodnot u účastníků studie, kteří užívali stejnou domácnost. 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 bisfenolů. To potvrzují i další, avšak nepřiliš 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. 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. 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. 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 (Koch et al. 2013, Harley et al. 2016, Černá 2015).

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 individuálními fyziologickými, zdravotními, sociálními a ekologickými faktory, které ovlivňují jak přísun ED, tak jejich eliminaci (např. zdravotní stav, užívání léků, 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 látce, 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). V rámci snižování expozice endokrinním disruptorům by proto mohly být efektivní kombinované preventivní přístupy. Proto informační materiál doporučuje 10 přístupů, které mohou potenciálně snížit nejen expozici ED, ale také dalším kontaminantům. 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), konzumaci 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 specifičtější 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).

6. Závěr

Primární cíl doktorského projektu, tj. zavedení *in vitro* metod pro identifikaci endokrinní disrupce chemických látek, které by prokázaly v opakovaných experimentech vysokou robustnost, transferabilitu, sensitivitu, specifitu a využitelnost byl splněn. 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. 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 ověřeny prediktivní indikátory bisfenolů a metabolitů ftalátů vhodné pro sledování 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 např. ze stravy, 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 nespécifické 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 v moči byly nižší než při zařazení dvou konzervovaných jídel a dvou nápojů v plechovkách do stravy.

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.

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. 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.

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. 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 mnohvrstevnou problematikou, že propojení jednotlivých preventivních oborů, jako je toxikologie, epidemiologie, chemie a biomedicína nutně vyžaduje.

7. Seznam literárních zdrojů

- 1 Albert O, Desdoits-Lethimonier C, Lesné L, Legrand A, Guillé F, Bensalah K, Dejuqc-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, Cannon 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, Náráy M, Halzlová K, Jajcay 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, Ombelet 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 skripta. Projekt FRVŠ 637/2013 a 236078/IPUK/2015. (Dostupné online: <http://fbt.cz/skripta/>, 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 (*S. 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 O1, 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-Camelò 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.
- 115 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
- 116 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.
- 117 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>
- 118 Marie C, L emery D, Vendittelli F, Sauv ant-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.
- 119 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.
- 120 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.
- 121 Matějů M, Střibrná 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.
- 122 Meeker JD (2012). Exposure to Environmental Endocrine Disruptors and Child Development. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 166(10): 952–958.
- 123 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.
- 124 Melmed S (2016). *Williams Textbook of Endocrinology*. Elsevier Health Sciences. pp. 621, 711. ISBN 978-0-323-29738-7.
- 125 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.
- 126 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.
- 127 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.
- 128 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.
- 129 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.
- 130 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
- 131 Müllerová D, Kopecký J (2007). White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 56: 375–381.
- 132 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.
- 133 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.

- 134 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
- 135 OECD (2007). Guidance Document on the Validation of (Q)SAR Models. OECD Series on Testing and Assessment, No. 69 (2007), OECD Publishing, Paris.
- 136 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)
- 137 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>.
- 138 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.
- 139 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.
- 140 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.
- 141 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.
- 142 Oziol L., Alliot F, Botton J, Bimbot M, Huteau V, Levi Y, Chevreuril 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.
- 143 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
- 144 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.
- 145 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.
- 146 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.
- 147 Patisaul HB (2017). Endocrine disruption by dietary phyto-oestrogens: impact on dimorphic sexual systems and behaviours. *Proc Nutr Soc.* 2017;76(2):130-144.
- 148 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
- 149 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.
- 150 Pinkas J, Gujski M, Wierzbińska-Stepniak 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:
- 151 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.

- 152 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.
- 153 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.
- 154 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.
- 155 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.
- 156 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.
- 157 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.
- 158 Ranci ere 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.
- 159 Raudrant D, Rabe T (2003). "Progestogens with antiandrogenic properties". *Drugs*. 63 (5): 463–92. doi:10.2165/00003495-200363050-00003.
- 160 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.
- 161 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.
- 162 Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walsler-Kuntz DR, vom Saal FS (2007). *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*. 24: 199–224.
- 163 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.
- 164 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.
- 165 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.
- 166 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.
- 167 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.
- 168 Rokyta R. a kol. (2015). *Fyziologie a patologick fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: Grada Publishing a.s., 2015. ISBN 8024799022, 9788024799025. Počet stran: 712
- 169 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.
- 170 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
- 171 Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 127(2011): 27–34.
- 172 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.

- 173 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.
- 174 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.
- 175 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.
- 176 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.
- 177 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.
- 178 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.
- 179 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.
- 180 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.
- 181 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).
- 182 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.
- 183 Schutte K, Szczepanska A, Halder M, Cussler K, Sauer UG, Stirling C, Uhlrich 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.
- 184 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.
- 185 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.
- 186 Silbernagl S, Despopoulos A (2004). Atlas fyziologie člověka. 6. vydání. Praha : Grada, 2004. 435s. ISBN 80-247-0630-X.
- 187 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.
- 188 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.
- 189 Slíva J (2010). Receptory pro estrogen a strukturně obdobné molekuly [online]. *Moderní babictví* 19: 2010. Dostupné online 12. 3. 2019: <https://www.levret.cz/publikace/casopisy/mb/2010-19/?pdf=103>.
- 190 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>
- 191 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.
- 192 Sohoni P, Sumpter JP (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol.* 1998 Sep;158(3):327-39.

- 193 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.
- 194 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.
- 195 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.
- 196 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.
- 197 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.
- 198 Thayer KA, Taylor KW, Garantziotis 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.
- 199 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.
- 200 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.
- 201 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.
- 202 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.
- 203 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.
- 204 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.
- 205 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.
- 206 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.
- 207 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, Leijts 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.
- 208 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.
- 209 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
- 210 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
- 211 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

- 212 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.
- 213 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
- 214 Vejdovszky 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.
- 215 Velázquez-Gómez M, Hurtado-Fernández E, Lacorte S. Comprehensive method for the analysis of multi-class organic micropollutants in indoor dust. Sci Total Environ. 2018 Sep 1;635:1484-1494. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.186. Epub 2018 Apr 25.
- 216 Vineis P, Kriebel D (2006). Causal models in epidemiology: past inheritance and genetic future. Environ Health. 2006 Jul 21;5:21.
- 217 Vrtačník P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J (2014). "The many faces of estrogen signaling". Biochimica Medica. 24 (3): 329–42.
- 218 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.
- 219 Wagner RL, Huber BR, Shiau AK, Kelly A, Cunha Lima ST, Scanlan TS, Apreletti JW, Baxter JD, West BL, Fletterick RJ (2001). Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. Mol Endocrinol. 15(3):398-410.
- 220 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
- 221 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.
- 222 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]
- 223 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.
- 224 Wuttke W, Jarry H, Becker T, Schultens A, Christoffel V, Gorkow C, Seidlová-Wuttke DV (2003). Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? Maturitas. 2003 Mar 14;44 Suppl 1:S9-20
- 225 Xenometrix (2015). XenoScreen YES/YAS Instructions for Use. Version 3.03, November 2015, p.1–22.
- 226 Xenometrix (2017). XenoScreen XL YES/YAS Instructions for Use. Version 3.07, May 2017, p.1–22.
- 227 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.
- 228 Yang NJ, Hinner MJ (2015). Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. Methods Mol Biol. 1266:29–53
- 229 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.
- 230 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
- 231 Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. Chemosphere. 82(2011): 424–430.
- 232 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]

- 233 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.
- 234 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.
- 235 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.
- 236 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.

8. Seznam internetových zdrojů

<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://fblt.cz/skripta/>
<https://zdрави.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://zdрави.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/neuroendokrinni-system-a-jeho-vyznam-neuroendokrinni-tumory-452347>
<https://zdрави.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/lekove-interakce-grapefruitove-stavy-a-vybranych-fytofarmak-300320>
<https://www.levret.cz/publikace/casopisy/mb/2010-19/?pdf=103>

9. Seznam publikací doktoranda

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace:

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]

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]

Kejlová K, Dvořáková M, Vavrouš A, Ševčík V, Kand'árová 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]

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace:

Jírova G, Vlkova A, Wittlerova M, Dvorakova M, Kasparova L, Chrz J, Kejlová K, Wittlingerova Z, Zimova M, Hosikova B, Jiravova J, Kolarova H (2019). Toxicity of wastewater from health care facilities assessed by different bioassays. *Neuro Endocrinol Lett.* 2019 Jan;39(6):441-453.
[IF (2017): 0,754]

Jírová G., Wittlingerová Z., Zimová M., Vlková A., Wittlerová M., Dvořáková M., Jírová D. (2016). Bioindicators of wastewater ecotoxicity. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016 Dec 18;37(Suppl1):17-24.
[IF (2016): 0,918]

Pindáková L., Kašpárková V., Kejlová K., Dvořáková M., Krsek D., Jírová D., Kašparová L. (2017). Behaviour of silver nanoparticles in simulated saliva and gastrointestinal fluids. *Int J Pharm.* 2017 Jul 15;527(1-2):12-20.
[IF (2017): 3,862]

Kejlová, K., Kašpárková, V., Krsek, D., Jírová, D., Kolářová, H., Dvořáková, M., Tománková, K., Mikulcová, V. (2015). Characteristics of silver nanoparticles in vehicles for biological applications. *Int J Pharm.* 2015 Oct 8. pii: S0378-5173(15)30292-1. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.024
[IF (2015): 3.994]

Tománková, K., Horáková, J., Harvanová, M., Malina, L., Soukupová, J., Hradilová, S., Kejlová, K., Malohlava, J., Licman, L., Dvořáková, M., Jírová, D., Kolářová, H. (2015). Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles *in vitro*. *Food Chem Toxicol.* 2015 Apr 3. pii: S0278-6915(15)00106-4. 5 year
[IF (2017): 3.584]

Janoušek S., Jírová D., Kejlová K., Dvořáková M. (2015). Nanoparticles in Health and Disease: An Overview of Nanomaterial Hazard, Benefit and Impact on Public Health Policy-Current State and Outlook. *Frontiers in Clinical Drug Research-Hematology*, Volume 2 01/2015; Bentham Science Publishers. ISBN: 978-1-68108-182-3.

Jírová. D., Kejlová, K., Janoušek, S., Bendová, H., Malý, M., Kolářová, H., Dvořáková, M. (2014). Eye irritation hazard of chemicals and formulations assessed by methods *in vitro*. *Neuro Endocrinol Lett.* 35(Suppl 2):133-140.
[IF (2017): 0,799]