

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jakub Houška

Mechanismy účinku bisfenolu A s důrazem na metabolismus a plodnost
Mechanisms of action of bisphenol A with emphasis on metabolism and fertility

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Daňková, PhD

Praha 2022

Prohlášení

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

V Praze, 04.01.2022

.....

Jakub Houška

Poděkování

Rád bych poděkoval své paní školitelce RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky, zkušenosti, čas a ochotu, které mi během zpracování mé závěrečné práce věnovala. Dále bych rád poděkoval své rodině, zvláště svému bratru Šimonu Houškovi, a mnohým přátelům (mj. z gymnázia a z farnosti Stodůlky) a dalším lidem, kteří mi byli po čas práce oporou a pomocí, zvláště Barboře Vavřichové a Vítu Matějčíkovi.

Abstrakt

Bisfenol A je endokrinní disruptor, tedy chemikálie vyskytující se v životním prostředí, lidmi konzumované stravě i vodě, která narušuje hormonální systém člověka i jiných organismů. Jakožto endokrinní disruptor má řadu negativních účinků na lidské zdraví. V této práci jsem se pokusil shrnout molekulární mechanismy těchto účinků se zaměřením na obezitu a plodnost. Mezi popisované mechanismy patří interakce bisfenolu s některými receptory, jeho vliv na syntézu enzymů i na epigenetické mechanismy jako metylace DNA či změny v expresi miRNA. V závěru práce se věnuji i možným způsobům eliminace zmíněných účinků.

Klíčová slova

bisfenol A, molekulární mechanismy, obezita, plodnost, receptor, epigenetické mechanismy, eliminace účinků

Abstract

Bisphenol A is an endocrine disruptor, a chemical which is found in environment and also in water and food consumed by people and which disrupts endocrine system of humans and other organisms. Being endocrine disruptor it has a wide scale of negative effects on human health. I have attempted reviewing the molecular mechanism of its action with special respect to obesity and reproduction in this paper including interactions of bisphenol with specific receptors, its impact on enzyme synthesis and also on epigenetic mechanisms as DNA methylation or changes in miRNA expression. Possible ways of elimination of bisphenol A effects are examined in the end of this work.

Keywords

bisphenol A, molecular mechanisms, obesity, fertility, receptor, epigenetic mechanisms, elimination of effects

Obsah

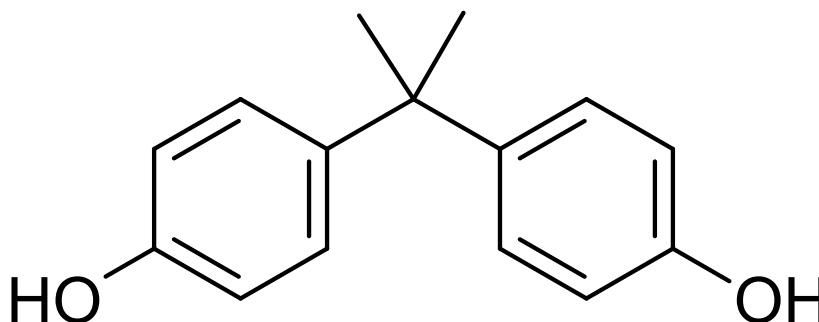
Obsah.....	0
1. Úvod	1
2. Mechanismy účinku BPA s důrazem na metabolismus a plodnost	2
2.1. Přímá vazba na receptor.....	2
2.1.1. Estrogenové receptory	2
2.1.2. GPR30	3
2.1.3. Androgenový receptor	5
2.1.4. Glukokortikoidní receptor	6
2.1.5. Receptor hormonů štítné žlázy	7
2.2. Vliv BPA na syntézu enzymů.....	8
2.3. Epigenetické regulace genomu	10
2.3.1. Příklady epigenetické toxicity BPA	10
3. Způsoby eliminace účinků BPA.....	16
4. Diskusní poznámka	19
5. Závěr.....	19
Seznam zkratk.....	21
Zdroje.....	22

1. Úvod

Endokrinní disruptory jsou chemické látky narušující funkci endokrinního systému člověka. Vyskytují se v mnoha věcech, které běžně používáme: od plastových lahví a nádob, vnitřku kovových konzerv, přes detergenty, hračky až po kosmetiku. Odtud se uvolňují do životního prostředí a také do člověka.

Patří mezi ně bisfenol A (BPA), ftaláty, polychlorované bifenyly (PCBs), polybromované difenylethery (PBDEs), fytoestrogeny (např. genistein), dichlordifenyltrichlorethan (DDT).

Většina jich je syntetizována uměle, ale existují i takové, které jsou přírodního (organického) původu (např. právě výše zmíněné fytoestrogeny). V lidském těle negativně ovlivňují celou řadu procesů, např. vývoj a plodnost. Mohou také způsobovat vznik nádorů, podporují vznik obezity, atd. (shrnutí v Yilmaz et al., 2019).



Obrázek 1 Chemický vzorec bisfenolu A (převzato z URL1)

Bisfenol A, jinak také 4'4'-isopropylidenediphenol (viz Obrázek 1) je chemická substance řadící se mezi endokrinní disruptory. Je prekurzorem výroby plastů (zvláště některých polykarbonátů) a epoxidových pryskyřic. Nachází se tedy všude kolem nás (Corrales et al., 2015), protože z těchto materiálů jsou vyráběny nádoby na jídlo i nápoje, termo papír, CD/DVD, zubní materiály atd.

Důležitým poznatkem (i pro naši práci) je, že BPA prochází přes placentální bariéru, jak navrhuje autoři Savabieasfahani et al., (2006) na základě práce *Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit.* (Schönfelder et al., 2002).

Relativně dlouho trvalo, než byla jeho škodlivost opravdu prokázána. Jednak kvůli jeho schopnosti působit v opravdu malých dávkách – tato schopnost byla totiž podceňována (shrnutí

v Welshons et al., 2003), a jednak kvůli střetu zájmů, kdy korporátně financované studie tvrdily, že BPA vlastně žádné negativní efekty nezpůsobuje (shrnutí v Welshons et al., 2006).

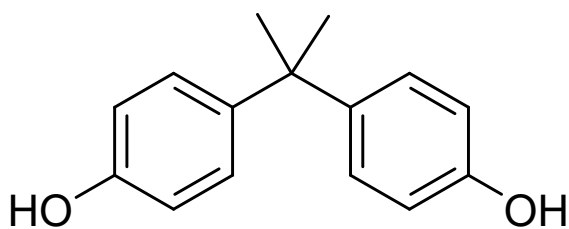
BPA se pro výrobu plastů používá od 50. let minulého století (shrnutí v Serini, 2000). Jeho světová produkce v roce 2023 je odhadována na 7 348 000 tun (URL10). Abychom alespoň zmínili, jak se k BPA staví současná legislativa, tak Evropská Unie (její Tribunál) v roce 2019 potvrdila závěry Evropské agentury pro chemické látky a zařadila BPA mezi tzv. *látky vzbuzující mimořádné obavy*, což je první krok na cestě k omezení jeho užívání (URL3). Zároveň je v Evropské Unii zakázáno používat BPA v dětských plastových lahvích (URL4) a od ledna 2020 v termo papíru, na který se tisknou účtenky (URL5). Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) však v roce 2014 ve své zprávě uvádí, že pro současnou úroveň expozice BPA skrze kontakt s jídlem existuje adekvátní bezpečnostní rozpětí (URL6).

2. Mechanismy účinku BPA s důrazem na metabolismus a plodnost

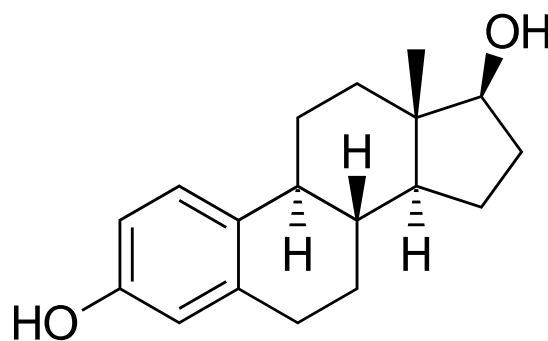
2.1. Přímá vazba na receptor

BPA se váže na celou řadu receptorů – mj. estrogenové receptory, GPR30, androgenový receptor, glukokortikoidní receptor a také receptor hormonů štítné žlázy (shrnutí v Cimmino et al., 2020).

2.1.1. Estrogenové receptory



Obrázek 3 Chemický vzorec bisfenolu A (převzato z URL1)



Obrázek 2 Chemický vzorec estradiolu (převzato z URL2)

Jak vidíme na obrázcích 2. a 3., BPA je estradiolu (klíčovém estrogenu) relativně strukturně podobný. Estrogeny jsou skupina pohlavních hormonů odpovědná za vývoj a regulaci pohlavních orgánů a sekundárních pohlavních znaků u žen. Důležité jsou také z hlediska růstu, vývoje a homeostázy. Mezi čtyři hlavní estrogeny patří estron (E1), estradiol (E2), estriol (E3) a estetrol (E4), přičemž v reprodukčním období ženy je hlavním 17β-estradiol (E2).

Estrogeny působí mj. skrze vazbu na klasické estrogenové receptory ER α a ER β , které ovšem nevážou pouze je, ale i jiné látky, jako např. právě BPA (kvůli jeho strukturní podobnosti s estradiolem – viz obrázky 2. a 3.) (Kuiper et al., 1998).

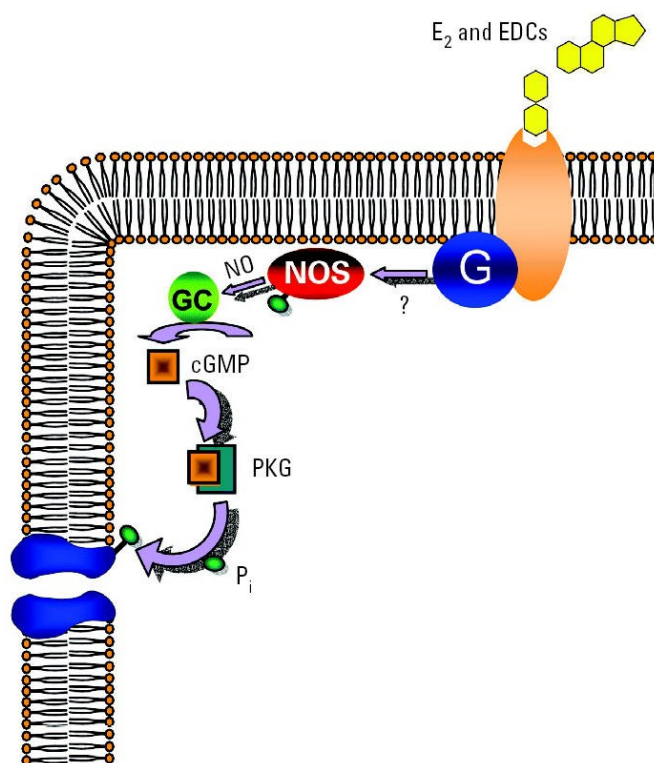
To, že BPA je tzv. xenoestrogen (látko napodobující, chovající se jako estrogen) víme již od roku 1936, kdy to objevil Edward Ch. Dodds (Dodds & Lawson, 1936). Afinita BPA k ER α a ER β je však 10000krát menší než afinita samotného estradiolu k těmto receptorům (Kuiper et al., 1998). Dále bylo pozorováno, že BPA kupodivu působí v malých dávkách, zatímco ve větších nemá žádný efekt (Angle et al., 2013).

Estrogeny jsou kromě výše uvedeného významné při regulaci diferenciaci tukové tkáně a ukázalo se, že BPA má na tuto oblast podobný vliv jako estradiol – ovlivňuje expresi adipogenních transkripčních faktorů (Phrakonkham et al., 2008). Dále bylo zjištěno, že BPA i estradiol inhibují expresi adiponektinu (Hugo et al., 2008) a stimulují uvolňování IL-6 a TNF α (Ben-Jonathan et al., 2009), což přispívá ke vzniku metabolického syndromu a obezity (shrnutí v Ben-Jonathan et al., 2009). I další studie naznačuje, že BPA je možné zařadit mezi obezogeny: na myších bylo ukázáno, že BPA má vliv na tělesnou hmotnost a rozložení tělesné hmoty, vždy ovšem záleží na pohlaví, dávce BPA a také období expozice (Rubin et al., 2017). Vliv pohlaví se ukázal, když byla CD-1 myš vystavena BPA nejen v perinatálním, ale i v peripubertálním období: u samic byly negativní efekty posíleny, u samců naopak rozdíl v hmotnosti a rozložení tělesné hmoty byly zmenšeny (Rubin et al., 2017). Můžeme spekulovat, že rozdílný vliv BPA na různá pohlaví tkví v tom, že pro samičky je determinujícím hormonem estrogen, zatímco pro samce testosteron. Tato diskrepance si určitě žádá další výzkum.

2.1.2. GPR30

G protein-coupled receptor 30 (GPR30) je transmembránový ne-klasický estrogenový receptor spouštějící negenomickou (a tedy rychlou) signalizační dráhu, která je zásadní pro zprostředkování účinků BPA v jeho malých dávkách (Nadal et al., 2000; Noguchi et al., 2002; Alonso-Magdalena et al., 2005).

Na myším modelu bylo ukázáno, že BPA v koncentraci 10^{-9} M (mol/dm^3) potlačuje v pankreatických α -buňkách integrovaných do Langerhansových ostrůvků signál, který spouští sekreci hormonu glukagonu. Inhibice se uskutečňuje skrze receptor spřažený s G-proteinem (GPR30 patří do této kategorie) a projevuje se jako potlačení oscilací vnitrobuněčných vápenatých iontů Ca^{2+} , které bývají vyvolané nízkým podílem glukózy v krvi (Alonso-Magdalena et al., 2005).



Obrázek 4 Signalizace BPA přes GPR30 receptor (převzato z Alonso-Magdalena et al., 2005)

Na obrázku 4. vidíme konkrétní mechanismus: estradiol (E_2) či BPA (na obrázku se píše „ E_2 and other EDCs“, tedy estradiol a další Endocrine Disrupting Chemicals) se váže na GPCR (G protein-coupled receptor – receptor spřažený s G-proteinem) nebo jiný receptor spojený s klasickým GPCR, který aktivuje G-protein. Tato signalizace je sensitivní vůči pertusovému toxinu (PTX), který G-proteiny inhibuje. GPCR je dále spojen (zatím se neví jak) s NOS – NO-syntázou (NO=oxid dusnatý), která generuje NO. Ten aktivuje rozpustnou guanylát cyklázu (GC), která zvyšuje hladinu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), což aktivuje cGMP-dependentní protein kinázu (PKG), která fosforyluje iontové kanály, a tak ruší oscilaci Ca^{2+} iontů (Alonso-Magdalena et al., 2005). Tento mechanismus (snížení signalizace α -buněk při nízké hladině glukózy v krvi způsobené BPA či E_2) by měl snížit glykogenolýzu, lipolýzu a také uvolňování mastných kyselin z tukových buněk, což by mělo přispívat k větší obezitě (Alonso-Magdalena et al., 2005).

2.1.3. Androgenový receptor

Androgeny jsou mužské-samčí pohlavní hormony zodpovědné za vývoj a udržování samčích znaků na těle obratlovců.

Ukázalo se, že BPA při vazbě na androgenový receptor (AR) působí jako antagonist androgenu, tedy má antiandrogenní účinky (Kojima et al., 2019; Sohoni & Sumpter, 1998). U této vazby jsou podstatné hydrofobní interakce a vodíkové můstky (Fang et al., 2003; Huang et al., 2019).

Bylo prokázáno, že BPA má antagonistické účinky na transkripční aktivitu AR indukovanou 5 α -dihydrotestosteronem (DHT) v koncentracích 10⁻⁹ – 10⁻⁵ M (Huang et al., 2019). Transkripční aktivitou AR je myšlena jeho aktivace vazbou ligandu a následná translokace do jádra, kde funguje jako transkripční faktor.

Jedním z mechanismů antagonistických účinků BPA je inhibice stabilizace AR. Ke stabilizaci dochází vazbou DHT, volný AR totiž samovolně degraduje (Huang et al., 2019). Stabilizace by mohla být zprostředkována fosforylací AR (shrnutí v Koryakina et al., 2014). Po vazbě androgenu/DHT dochází také k dimerizaci AR-androgen komplexu skrze intramolekulární interakci mezi N- a C- koncem. Tato interakce snižuje rychlost disociace androgenu a stabilizuje onen dimer složený ze dvou AR-androgen komplexů (shrnutí v Tan et al., 2014). A BPA právě tuto stabilizaci inhibuje. Je možné, že se tak děje jednak skrze narušení N/C interakce AR, anebo skrze indukci ubiquitinace AR (Huang et al., 2019). Bylo totiž ukázáno, že ubiquitin-proteazomová dráha je hlavní drahou degradace AR (Salami et al., 2018).

Dalším mechanismem účinku BPA na AR je zrušení DHT-dependentní disociace AR od Hsp90 (90-kDa heat shock protein). Bez navázaného androgenu se totiž AR nachází v cytoplasmě spojen s Hsp90 (shrnutí v Gelmann, 2002; Liu et al., 2018), který ho inaktivuje (Li et al., 2014). Jakmile se androgen naváže, indukuje disociaci AR od Hsp90, což umožňuje translokaci AR do jádra (Ni et al., 2013; shrnutí v Srinivas-Shankar & Wu, 2006). Disociace AR od Hsp90 byla pozorována v průběhu první hodiny expozice DHT. Když došlo k expozici BPA, DHT-dependentní disociace AR-Hsp90 komplexu neproběhla. Mohlo by to být kvůli tomu, že BPA se váže do kapsy vázající hormon na ligand vazebné doméně AR, brání tak vazbě DHT na AR, a tedy brání i následné DHT-dependentní disociaci AR-Hsp90 komplexu (Huang et al., 2019).

Zároveň s těmito mechanistickými daty epidemiologické studie ukázaly, že BPA může mít negativní vliv na reprodukci u mužů (Manfo et al., 2014). Muži, kteří byli ve svém

pracovním prostředí vystavení BPA, vykazovali vyšší hladiny BPA v moči / krvi. Ty byly spojeny s abnormálním spermatem, nižším libidem a erektilními a ejakulačními potížemi. Navíc se zdá, že vliv BPA na plody mužského pohlaví je silnější, když k jeho působení dojde *in utero* (Manfo et al., 2014).

BPA tedy může negativně působit na mužskou reprodukci skrze antagonistické účinky na AR.

2.1.4. Glukokortikoidní receptor

Glukokortikoidní receptor (GR) je jaderný receptor, který váže kortizol a další glukokortikoidy (podmnožina steroidních hormonů). Hlavním způsobem jeho činnosti je regulace transkripce genů souvisejících s metabolismem, vývojem a imunitní odpovědí.

Ve studii Atlasové a kolektivu (2014) zkoumali vliv BPA na metabolismus. V jejich transkripčních testech se třemi různými promotory citlivými na glukokortikoidy se ukázalo, že BPA pravděpodobně nefunguje jako farmakologický glukokortikoid a že neaktivuje transkripční aktivitu glukokortikoidního receptoru (Atlas et al., 2014). Existují ovšem i opačné výsledky: ve studii Sargise a kolektivu (2010) se BPA choval ke GR jako agonista a přímo ho aktivoval (autoři pracovali s vysoce responsivním promotorem myšního prsního nádorového viru (mouse mammary tumor virus, MMTV), který obsahuje sekvenci citlivou na glukokortikoidy).

GR patří sice mezi jaderné receptory, ovšem jako takový (bez navázaného ligandu) se vyskytuje v cytoplasmě – po vazbě ligandu se přesouvá do jádra, kde aktivuje transkripci cílových genů (Carrigan et al., 2007). Atlasová se spoluautory (2014) se domnívá, že jednou z možností, jak by BPA mohl umocňovat činnost GR, je vliv na jeho umístění v buňce. Potenciálně podporuje translokaci GR do jádra, a tak zvyšuje jeho aktivitu. Sami však přiznávají, že jejich výsledky takovou možnost nepodporují: transientní transfekcí vpravili do svého buněčného modelu (Cos7-buňky) expresní vektor GR značený zeleným fluorescenčním proteinem (GFP-GR); buňky vystavili buď BPA, nebo dexametazonu (DEX) a pomocí fluorescenční mikroskopie pozorovali, jak se mění umístění GR v buňce. BPA ovšem nezpůsobil žádný rozdíl, kvůli čemuž se tedy autoři této studie kloní k závěru, že vztah BPA a GR není vztahem klasického agonismu (Atlas et al., 2014).

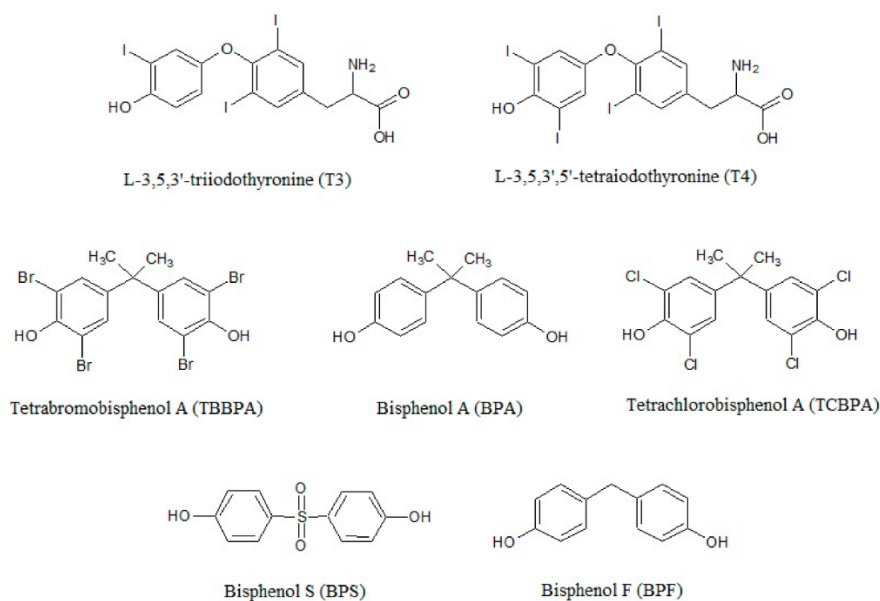
Ovšem jistou roli v působení BPA na organismus glukokortikoidnímu receptoru autoři diskutované studie přisuzují, a to konkrétně v adipogenezi. Ve své práci si všímají toho, že BPA navýšil úroveň exprese adipogenního markeru proteinu aP2 skrze vliv na transkripční aktivitu

CCAAT-enhancer binding proteinu δ (C/EBP δ) a GR na promotoru aP2. Jedním z mechanismů, skrze který tedy BPA působí (navyšuje expresi aP2), je spolupráce GR a členů C/EBP rodiny (jako např. C/EBP δ) na specifických cílových promotorech (promotoru aP2) (Atlas et al., 2014).

Práce Atlasové a kolektivu (2014) tak naznačuje, že kromě navýšení exprese proteinu aP2 dochází v reakci na BPA ke zvýšení diferenciaci adipocytů, a tedy potenciálně ke vzniku obezity.

2.1.5. Receptor hormonů štítné žlázy

Receptor hormonů štítné žlázy (jinak také thyroid hormone receptor, TR) patří mezi jaderné receptory a váže především hormon zvaný trijodtyronin (T3) produkovaný štítnou žlázou (Flamant et al., 2006). Mezi účinky T3 významné v kontextu této práce patří bezesporu regulace metabolismu, růstu a vývoje lidského organismu (URL8). BPA interaguje s TR mj. díky své velké strukturní podobnosti s hormony štítné žlázy (tyroidními hormony) viz obrázek (shrnutí v Gorini et al., 2020).



Obrázek 5 Bisfenol A, jeho analogy bisfenol F a bisfenol S, halogenované deriváty tetrabromobisfenol A a tetrachlorobisfenol A jsou do velké míry podobné tyroidním hormonům co se týče jejich chemické struktury (převzato ze shrnující práce (review) Gorini et al.)

Shrnující práce Goriniové a kolektivu (2020) dala dohromady experimenty na lidech i *in vitro* a *in vivo* modelech a jejich porovnáním došli autoři k závěru, že BPA funguje jakožto selektivní TR antagonist, což znamená toto: BPA se chová převážně jako antagonist TR (antagonisté se na daný receptor vážou, ale odpověď nespouští – jeho funkci tedy blokují),

ovšem někdy se může chovat i jako agonista a někdy se signalizací přes tyroidní hormon (TH) vůbec neinteragovat (Gorini et al., 2020). Různé studie totiž docházejí k odlišným výsledkům.

Například práce Moriyamy a kolektivu (2002) tvrdí, že BPA se opravdu vůči TR chová jako antagonist – inhibuje transkripci spouštěnou TR tím, že inhibuje vazbu hlavního tyroidního hormonu T3 na TR a také tím, že rekrutuje C-koncovou polovinu ko-represorového proteinu vázajícího se na TR (Moriyama et al., 2002).

V této oblasti je tedy ještě třeba dalších výzkumů, které odhalí, jak to tedy se vztahem BPA k TR je.

2.2. Vliv BPA na syntézu enzymů

Poruchy reprodukce a metabolismu jsou ve vztahu k BPA zmiňovány ve studii Veiga-Lopezové a kolektivu (2013), která zkoumala, jak vystavení BPA v průběhu gestace ovlivňuje transkriptom vaječníků ovčího plodu. Gravidní ovce (plemeno Suffolk) byly vystaveny 0,5 mg/kg BPA denně, podáno subkutánně, a to mezi 30. a 90. dnem gravidity. A vaječnickový transkriptom byl zkoumán za pomoci RT-PCR, analyzována byla RNA odebraná v 65. a 90. den gravidity. Jaké byly výsledky? Co se týče klíčových regulátorů vývoje vaječníků, tak byla zaznamenána zvýšená exprese mRNA *Cyp19* neboli aromatázy. Tento enzym konvertuje androgeny v estrogeny. A dále byla pozorována zvýšená exprese mRNA 5α -reduktázy, ta konvertuje testosteron na dihydrotestosteron. Tyto výsledky jsou konzistentní s tím, že BPA je xenoestrogen, a mohly by souviset s postnatálními reprodukčními poruchami, jak je popsáno v jiné studii provedené na stejném plemeni ovcí (Savabieasfahani et al., 2006). Tam bylo ukázáno, že při narození vážila jehňata vystavená prenatálně BPA méně oproti kontrole (v pubertě už rozdíl mezi skupinami pozorován nebyl). Samičky vystavené BPA byly hypergonadotropické v průběhu raného postnatálního života a jejich první reprodukční období končilo později (bylo prodlouženo) v porovnání s kontrolou. Také u nich bylo pozorováno výrazné utlumení magnitudy nárustu luteinizačního hormonu (Savabieasfahani et al., 2006). To vše svědčí o tom, že BPA má dlouhodobý vliv na řadu reprodukčních endokrinních parametrů, které negativně působí na plodnost.

Zvýšení exprese mRNA *Cyp19* následkem prenatální expozice BPA bylo pozorováno také ve vaječnicích CD-1 myši (Xi et al., 2011). Konkrétně bylo podáváno 12-50 mg/kg za den od 1. gestačního dne do 20. dne po narození. Zkoumán byl vliv BPA na osu hypotalamus–hypofýza–gonády (HHG), tedy systém tří spolupracujících endokrinních žláz.

Na úrovni hypotalamu a hypofýzy byla pozorována zvýšená exprese mRNA KiSS-1, gonadotropiny uvolňujícího hormonu (GnRH) a folikulostimulačního hormonu (FSH) jak u samic, tak samečků. KiSS-1 totiž indukuje transkripci GnRH a FSH, což odpovídá fyziologické roli osy HHG v regulaci puberty a rozmnožování u živočichů (Kaiser & Kuohung, 2005; shrnuto v Kuohung & Kaiser, 2007).

Na úrovni gonád BPA inhiboval expresi steroidogenních enzymů ve varlatech a syntézu testosteronu u samečků, a naopak podporoval expresi *Cyp19* (viz výše) a syntézu estrogenu u samic. Tato data odpovídají i práci Kima a kolektivu (2010) na krysách, kde dávky 100-200 mg/kg BPA denně (podle tělesné hmotnosti) potlačily expresi steroidogenních enzymů v krysách varlatech.

Mechanismus těchto účinků pravděpodobně nesouvisí se signalizací přes ER (estrogenový receptor), ale spíše by mohl tkvět v působení BPA na steroidogenezi v pohlavních žlázách a následném anomálním uvolňování steroidních hormonů (Xi et al., 2011). Protože kdyby zde BPA využíval své role estrogenového agonisty, jeho příspěvek k celkovému množství estrogenových ekvivalentů v krvi samic by byl příliš malý ve srovnání s množstvím estrogenových ekvivalentů od endogenních estrogenů. Tedy mechanismus jeho působení musí být jiný (Xi et al., 2011). Dokládá to i fakt, že samečci by v případě působení BPA jako estrogenového agonisty museli být na takový vliv citlivější, neboť v nich koluje estrogenu méně (Xi et al., 2011).

BPA tedy pravděpodobně narušuje dráhy syntetizující steroidní hormony a způsobuje jejich vylévání do krevního oběhu. Jde např. o estradiol či testosteron. A změna hladiny pohlavních hormonů může narušovat zpětnovazební regulační mechanismy osy HHG, a tak možná způsobovat i reprodukční dysfunkce. Je otázkou, nakolik tato data získaná na myších (Xi et al., 2011) jsou relevantní pro člověka. Relevantnější budou pro jedince, kteří by byli vystaveni velkým dávkám nebo také byli vystaveni BPA v zaměstnání (He et al., 2009).

BPA má ovšem vliv také na Graafův folikul a folikulární buňky, kde narušuje syntézu estradiolu viz práce na lidských folikulárních buňkách autorů Kwintkiewicz a kolektivu (2010) nebo práce na myším modelu autorů Peretze a kolektivu (2011). Přímou ve folikulárních buňkách ovlivňuje expresi steroidogenního akutního regulačního proteinu (Star/STARD1) a *Cyp11a1* (Peretz et al., 2011). Celkově tedy především interferuje se syntézou estradiolu ve vaječníku, čímž opět ovlivňuje reprodukční funkce (Kwintkiewicz et al., 2010; Peretz et al., 2011).

Při studiu těchto mechanismů docházejí autoři i k rozdílným výsledkům. Veiga-Lopezová a kolektiv si myslí, že za těmito rozdíly stojí tyto faktory: studované druhy, časování expozice BPA vs. časování vývoje vaječnicků, věk měření a dosažená vnitřní dávka BPA.

2.3. Epigenetické regulace genomu

Předpona „epi-“ znamená „nad“, proto epigenetika se zabývá dědičností nad rámec klasické genetiky – jejím zprostředkovatelem není sekvence nukleotidů. Mezi epigenetické mechanismy řadíme například kovalentní modifikace DNA (metylace, metylován bývá nejčastěji cytosin z CpG dinukleotidu), změny v hladině miRNA či modifikace histonů.

2.3.1. Příklady epigenetické toxicity BPA

2.3.1.1. Metylace DNA

První poznatky o vlivu BPA na metylaci DNA pochází z výzkumu na krysách z roku 2006 (Ho et al., 2006). Hypometylace konkrétního CpG ostrova u genu *PDE4D4* způsobená účinky BPA měla za důsledek kontinuální zvýšenou expresi fosfodiesterázy typu 4 varianty 4 (PDE4D4). Tento enzym je zodpovědný za degradaci cAMP, molekuly hrající roli tzv. druhého posla v mnoha signalizačních drahách. Bylo ukázáno, že skrze zvýšenou expresi PDE4D4 BPA způsobuje v dospělosti vyšší náchylnost prostatické žlázy ke vzniku předrakovinových lézí a hormonální karcinogenezi (Ho et al., 2006).

Mezi další práce ukazující vliv BPA na metylaci DNA patří studie Dolinoyové a kolektivu (2007) na *Agouti viable yellow* (*A^{vy}*) myších. Exprese genu *Agouti* závisí na míře metylace retrotransposonu vloženého k *Agouti* genu směrem k 5' konci. Pokud je oblast hypometylovaná, srst myši je čistě žlutá, pokud hypermetylovaná, tak pseudoagouti hnědá. V této studii se ukázalo, že expozice matky BPA způsobila hypometylacii, a tedy posun ke žluté barvě srsti u potomků (Dolinoy et al., 2007). Závislosti exprese *Agouti* genu na míře metylace retrotransposonu k němu vloženého bylo později využito k experimentům s podáváním třech různě velikých dávek BPA a zkoumání jejich vlivu na metylaci DNA (Anderson et al., 2012). Hypermetylace byla odhalena v ocasní tkáni potomků matky vystavené BPA ve všech třech případech.

Pro vliv BPA na metylaci DNA je zásadní prenatální období. To bylo prokázáno na březích CD-1 myších, kterým byl injikován BPA v dávce 5 mg/kg intraperitoneálně (do břišní dutiny) mezi 9.-16. dnem březosti. Zkoumala se exprese homeotického genu *Hoxa10* v porovnání s kontrolou. Množství mRNA a proteinů *Hoxa10* genu v reprodukční soustavě myší vystavených BPA *in utero* se zvýšilo o 25 % oproti kontrole. A metylace CpG

dinukleotidů myši vystavených BPA *in utero* se snížila ze 67 % na 14 % v promotoru *Hoxa10* genu a ze 71 % na 3 % v intronu *Hoxa10* genu (Bromer et al., 2010).

DNA metylaci u savců obstarávají DNA metyltransferázy (DNMTs). Autoři studie Bromer a kolektiv (2010) spekulují, že BPA by mohl působit na DNMTs přímo nebo přes s těhotenstvím související homeostatické mechanismy nebo přes příjem potravy matkou. Ovšem výsledky jejich vlastní studie to nepotvrzují – nebylo pozorováno trvalé snížení hladin mRNA DNMTs. Autory však napadlo, že ke snížení exprese či aktivity těchto enzymů mohlo pravděpodobně dojít v průběhu embryogeneze a posléze se exprese standardizovala před tím, než proběhl jejich test. O roli DNMTs v mechanismu demethylace způsobené BPA tak zatím pouze spekulujeme a k potvrzení nebo vyvrácení těchto spekulací bude potřeba dalších výzkumů.

Promotor genu *Hoxa10* u CD-1 myši obsahuje tzv. estrogen response element (ERE) (Bromer et al., 2010), což je oblast, na kterou se váže estrogenový receptor (ER) (shrnutí v Klinge, 2001). BPA způsobuje hypometylaci ERE, což vede nárůstu vazeb mezi ERE a ER neboli ERE se stává více estrogen-responsivní. Klíčové je, že tato epigenetická modifikace ERE přetrvává do dospělého věku, proto můžeme říci, že vnitroděložní prostředí (BPA) programuje (opravdu jde o změnu vývojového programování *Hoxa10*) sílu estrogenové odpovědi v dospělosti, a tak působí na reprodukci a další procesy, které estrogen ovlivňuje. Autoři studie Bromer a kolektiv (2010) se domnívají, že trvalé epigenetické změny v citlivosti ERE na estrogen by mohly být obecným mechanismem, skrze který endokrinní disruptory uplatňují svůj vliv.

Pro vyjasnění: tento mechanismus, skrze který BPA působí na metylaci DNA a embryonální vývoj, je pravděpodobně nezávislý na jeho estrogenové aktivitě (Bromer et al., 2010) neboť jak jsem výše popisoval, nejde o estrogenovou aktivitu BPA jako takovou, ale o jeho demetylační aktivitu, která, když se uplatňuje na ERE promotoru *Hoxa10* genu, zvyšuje citlivost tohoto genu na estrogen.

Autoři citované studie také pozorovali nepřítomnost změn v metylaci po expozici BPA u dospělých jedinců. Působení BPA u nich nevedlo k epigenetickým úpravám genomu. Můžeme tedy říci, že k epigenetické modifikaci dochází pouze v průběhu určitého kritického vývojového období - schopnost BPA působit změny v epigenomu (metylací DNA) je tedy funkcí specifickou pro embryogenezi (Bromer et al., 2010).

Významné je také zamyslet se nad rolí genu *Hoxa10*. Tento gen se podílí na rýhování embryonální dělohy (shrnuto v Du & Taylor, 2004), ovšem exprimován je i v dospělosti, a to konkrétně v děložní sliznici, kde je nutný pro zahnízdění oplozeného vajíčka, přičemž ho regulují pohlavní hormony (shrnuto v Daftary & Taylor, 2000; shrnuto v Du & Taylor, 2004). Vliv BPA na jeho expresi by mohl být vysvětlením mechanismu účinků (estrogenových; endokrinně-disruptivních) BPA na reprodukční soustavu.

Vliv BPA na metylaci DNA se ovšem neprojevuje pouze reprodukčními a vývojovými dysfunkcemi, ale také poruchami metabolismu. Na CD-1 myši (samečcích) bylo ukázáno, že středně staří jedinci po 10ti měsíční expozici BPA (0,5 µg/kg/den; tedy člověku relevantní dávce) prokazovali obezitu, glukózovou intoleranci, dyslipidemii a jaterní akumulaci triglyceridů a cholesterolu (Ke et al., 2016).

V jaterních buňkách exponovaných myšáků byla snížena úroveň metylace *Srebf1* a *Srebf2*, a zároveň zvýšena exprese těchto genů, což by mohlo vést ke zvýšení exprese těch genů, které regulují syntézu tuků (Ke et al., 2016).

Dále hladina exprese DNA metyltransferáz v jaterních buňkách exponovaných jedinců byla snížena (Ke et al., 2016). Protože DNMTs mají globální vliv, pravděpodobně modulují DNA metylační vzorce celého jaterního genomu, a tudíž expozice BPA může způsobovat řadu zdravotních problémů. Mezi potenciální mechanismy, které jsou podkladem narušení jaterního metabolismu tuků, by mohly patřit zvýšení syntézy mastných kyselin a cholesterolu, úpravy v transportu triglyceridů a cholesterolu a také snížení oxidace mastných kyselin (Ke et al., 2016).

V buněčné linii Hepa1-6 ošetřené BPA byly pozorovány podobné změny jako u myších samců: snížení hladiny exprese DNMTs a zvýšení hladin exprese genů zapojených do syntézy tuků. Vyřazení DNMTs z provozu vedlo k hypometylaci a zvýšené expresi genů zodpovědných za syntézu lipidů (Ke et al., 2016).

Tyto výsledky naznačují, že dlouhodobá expozice BPA může způsobit akumulaci tuků v játrech, která by mohla být zapříčiněna epigenetickým přeprogramováním genů zodpovědných za syntézu tuků (například úpravami DNA metylačních vzorců).

Akumulace tuků v játrech zapříčiněná odchylkami v jejich syntéze může vést až k závažným patologiím jako je nealkoholická steatohepatitida nebo srdeční příhoda (Ke et al., 2016). To, že upravení syntézy tuků hraje významnou roli v poruchách indukovaných BPA, bylo ukázáno už dříve (Marmugi et al., 2012, 2014).

Zajímavostí je, že vliv BPA na geny lipidového metabolismu myši zřejmě závisí na jejich věku (Ke et al., 2016). U mladších myši byla zvýšena exprese genů *Cpt1a*, *Acox1* (klíčové geny pro oxidaci mastných kyselin) a *Cyp7a1* (zásadní pro export cholesterolu z jaterních buněk do žluči). Zároveň *Cpt1a*, *Acox1* byly u starších myši exprimovány méně, zatímco *Cyp7a1* byl u nich exprimován stejně jako u kontroly. Toto vše by mohlo být díky tomu, že u mladších myši existuje jakási zpětnovazebná regulace působící tak, aby nedocházelo ke hromadění nadbytečných triglyceridů a cholesterolu. U starších myši byly dále zaznamenány větší změny v expresi těchto genů: *Srebf1* (klíčový pro indukci syntézy tuků v játrech, Shimano et al., 1999), *Fasn*, *Scd1*, *Hmgcr*, *Cpt2*, *Cyp4a14*, *Hnf4a* a *Ppara* (hlavní regulátor metabolismu tuků v játrech) než u myši mladších (Ke et al., 2016).

Můžeme tedy říci, že odchylky v expresi genů spojených s lipidovým metabolismem mohou vést u starších myši ke vzniku metabolických poruch. Souvisí s tím i to, že hypometylace DNA indukovaná BPA se s věkem akumuluje a akceleruje deregulované expresní vzorce genů. Opravdu u stárnoucích zvířat bylo pozorováno snížení celkové metylace (Mays-Hoopers et al., 1986; Wilson et al., 1987) a to samé bylo zaznamenáno i u člověka (Day et al., 2013).

Ve shodě s tím bylo u myši exponovaných BPA zachyceno oproti kontrole snížení průměrných hladin metylace *Srebf2*, *Fasn* a *Hmgcr* (Ke et al., 2016). A průměrné hladiny metylace těchto tří genů u mladší myši vystavené účinku BPA byli srovnatelné s úrovněmi metylace těchto genů u starší kontrolní myši. Z toho autoři práce Ke et al., 2016 vyvozují zajímavou spekulaci, a to, že tato srovnatelnost mladší myši BPA vystavené s myši starší BPA netknuté by mohla souviset s raným nástupem metabolických poruch v současné společnosti (Ke et al., 2016).

Výsledky této studie také naznačují, že DNA metylace je k vlivu BPA náchylnější spíše v rané dospělosti než ve středním věku.

Další studií, která zkoumala molekulární mechanismy vlivu BPA na metabolismus (vznik obezity) je práce Bastosové Salesové a kolektivu (2013). Autoři pozorovali podpůrný efekt BPA na diferenciaci adipocytů na modelu 3T3-L1 buněk, což je buněčná linie pocházející z myši, bývá na ní zkoumána tuková tkáň. Zároveň byla v těchto buňkách po podání BPA (80 µg) výrazně snížena globální metylace DNA.

Mezi velmi významné práce pojednávající o vlivu BPA na epigenom patří studie Junge et al., 2018. Autoři kombinují epidemiologická data s těmi z experimentů s *in vivo* i *in vitro*

modely. Klíčovým přínosem této práce je získání více důkazů pro to, že BPA by mohl způsobovat hypometylaci CpG místa v promotoru mesoderm-specifického transkriptu (mesoderm-specific transcript - *MEST*), a tak podporovat adipogenezi, a tedy přispívat ke vzniku obezity u dětí do 6 let (Junge et al., 2018).

MEST je paternálně imprintovaný gen; kóduje jednoho ze členů α/β hydrolázové superrodiny a jeho exprese je spojena s obezitou (Kamei et al., 2007; Soubry et al., 2013), velikostí adipocytů (Takahashi et al., 2005) i proliferací preadipocytů (Kadota et al., 2009), jak ukázaly studie na myších i lidech. Už dříve si vědci povšimli propojení hypometylace *MEST* a obezity u lidí (Carless et al., 2013; El Hajj et al., 2013). Ovšem musíme brát výsledky studie Junge et al., 2018 s jakousi rezervou, protože aplikované dávky BPA byly mnohem vyšší než jsou u lidí běžné, přesto autoři tvrdí, že jejich data mohou podporovat hypotézu o aktivaci *MEST* pomocí BPA, což potvrzuje roli *MEST* v adipogenezi indukované BPA (Junge et al., 2018).

Výše zmíněné experimenty na modelových organismech můžeme propojit s celou řadou epidemiologických studií zkoumajících, zda BPA způsobuje obezitu u člověka. Například průřezová studie na dětech v USA pozorovala signifikantní korelaci mezi obezitou a koncentrací BPA v moči (Trasande et al., 2012). Také Legeay a Faure, autoři souhrnné práce, se kloní k závěru, že BPA pravděpodobně environmentálním obezogenem je, vnímají ovšem potřebu dalších metaanalýz, které by daly definitivní jistotu (shrnutí v Legeay & Faure, 2017).

2.3.1.2. Změny v hladinách miRNA

MicroRNA (miRNAs) jsou krátké přirozeně se vyskytující nekódující úseky ribonukleové kyseliny (19-25 nukleotidů). V rámci posttranskripčních mechanismů se párují s 3' netranslatovaným koncem cílových mRNAs, a tak blokují translaci mRNA, anebo směřují transkript mRNA k degradaci (Klinge, 2009). Jsou regulovány estrogenem přes ER α a ER β , a to tkáňově i buněčně specifickým způsobem, a protože BPA je xenoestrogen, tak i on má na jejich regulaci vliv: jednak je zapojen do jejich sestřihu, jednak je reguluje přímo skrze jejich promotorové EREs (Klinge, 2009; Klinge, 2015). Role estrogenové regulace exprese miRNAs i cílové geny těchto miRNAs i úloha miRNAs ve stárnutí ovšem musí být dále zkoumány (Klinge, 2009). Estrogenem regulované miRNAs by mohly mít určitý význam v homeostázi, laktaci, rakovině, a především reprodukci a metabolismu.

Právě poruchy reprodukce a metabolismu jsou ve vztahu k BPA zmiňovány ve studii, která zkoumala, jak vystavení BPA v průběhu gestace ovlivňuje transkriptom vaječnicků ovčímho plodu (Veiga-Lopez et al., 2013). Část výsledků této práce již jsme shrnovali výše v kapitole

2.2 Vliv BPA na syntézu enzymů. Z epidemiologického hlediska v ní byl pozorován vliv BPA na diferenciaci gonád, folikulogenezi a insulinovou homeostázi (Veiga-Lopez et al., 2013). Dále bylo u těchto ovcí zaznamenáno snížení exprese miRNAs: 65. gestační den byla exprese snížena u 45 miRNAs, 90. gestační den u 11 miRNAs. Pouze u jedné miRNA bylo patrné snížení exprese v obou těchto dnech, šlo o miR-203 (Veiga-Lopez et al., 2013).

V následujících odstavcích se seznámíme s miRNAs, jejichž exprese byla pod vlivem BPA významně snížena. miR-137 potlačuje produkci progesteronu, androgenů a estrogenů (Sirotkin et al., 2009), potažmo tedy ovlivňuje reprodukční funkce.

Dále exprese miR-765 byla snížena u pacientek s předčasným ovariálním selháním (URL9), což je porucha funkce vaječníků podobající se předčasné menopauze. I zde tedy vidíme možný způsob, skrze který BPA působí na lidskou plodnost.

Zkoumáním miR-let-7 (konkrétně jde o let-7a, let-7c, let-7d, let-7e a let-7g) bylo odhaleno snížení exprese let7a-2-3p v 65. dni gestace ve vaječnicích ošetřených BPA (Veiga-Lopez et al., 2013). Zároveň s tím byla zaznamenána zvýšená exprese Cyp19 mRNA, jež je cílovou molekulou miR-let-7. Další studie by měly prokázat tuto kauzalitu a také určit, zda je vliv miRNA na Cyp19 přímý, nebo nepřímý.

Dále můžeme spojit více různých miRNAs, u kterých bylo pozorováno snížení exprese, s ligandem kit nebo rodinou tzv. Sry-related high-mobility-group box (SOX) genů, konkrétně tedy s geny ze tří jejich podskupin SOXC (SOX4, SOX11, SOX12), SOXD (SOX6), SOXE (SOX8, SOX9). Geny SOX hrají klíčovou roli v určení pohlaví a embryonálním vývoji (Kiefer, 2007), a tak by navýšení jejich exprese kvůli snížení míry jejího umlčování mohlo vést k narušení germinální linie. Ligand kit (jinak také stem cell factor) se podílí na spermatogenezi, i zde vidíme tedy potenciální mechanismus vlivu BPA na reprodukční funkce.

A dalších 15 miRNAs potenciálně cílí na geny zapojené do regulace insulinové signalizace. Jde o geny IGF (Igf1, Igf2), příbuzné vazebné proteiny (Igfbp3, Igfbp4, Igfbp5, Igf2bp1, Igf2bp2) i o insulinem indukovaný gen (Insig1).

Tyto poznatky jsou v souladu s předchozími studiemi, které ukazují narušení insulinové homeostázy kvůli působení BPA (Alonso-Magdalena et al., 2010). Alonso-Magdalena a kolektiv spojují vliv BPA s metabolickými poruchami souvisejícími s glukózovou homeostázou a tvrdí, že BPA by mohl být rizikovým faktorem pro diabetes.

Musíme ovšem podotknout, že miRNAs nezávisle na svém vlivu na stabilitu mRNA regulují také proces translace, a proto nemůžeme odvozovat účinky konkrétních miRNA pouze z analýzy mRNA exprese. Ve skutečnosti totiž jen velmi málo miRNAs koreluje se svými předpokládanými cíly (Nunez-Iglesias et al., 2010). Je to vidět i ve studii Veiga-Lopez et al. na příkladu domnělého cíle miR-203 (u ní jediné bylo v tomto experimentu pozorováno snížení exprese jak v 65., tak v 90. dni gestace). Tímto cílem by měl být ESR1, ovšem žádné změny na úrovni mRNA ESR1 či mRNA s insulinem souvisejících genů nebyly pozorovány.

Když shrneme práci Veiga-Lopez et al., tak expozice BPA v průběhu gestace u ovcí působí redukci exprese většiny miRNAs. BPA by tedy mohl ovlivňovat sestřihový aparát miRNAs. (Už dříve bylo ukázáno, že steroidy (také estrogen) hormonálně regulují miRNA biogenní enzymy (Nothnick et al., 2010)). Ovšem nedostatek změn v expresi sestřihových enzymů jako Drosha, Dicer, DGCR8 ukazuje na to, že BPA zasahuje do procesu sestřihu, sestřihového aparátu na jiné úrovni: například na úrovni jaderného exportu miRNA (Exportin) nebo na úrovni komplexu, který pomáhá zralé miRNA uplatnit svou funkci nezávisle na Ago2 (RNA induced silencing complex neboli RISC) (Davis-Dusenbery & Hata, 2010). Případně by BPA mohl ovlivňovat syntetickou dráhu miRNA, a to modulací proteinové exprese nebo proteinové aktivity jednoho či více komponentů této dráhy. Další možností je, že BPA potenciálně cílí na ERE v promotorech konkrétních miRNA genů (Veiga-Lopez et al., 2013).

MiRNAs obecně mohou mít za cíl několik genů. V situaci, kdy BPA snižuje expresi několika vaječnickových miRNA v průběhu rané diferenciaci vaječníků, by mohlo docházet až k systémovému působení BPA. Ovšem v jakém rozsahu je narušení exprese vaječnickových miRNA příčinou reprodukčních dysfunkcí popsaných výše u ovcí exponovaných BPA prenatálně, zůstává stále otázkou, a relevance ve vztahu k lidskému prenatálnímu vývoji je také nejistá (Veiga-Lopez et al., 2013). Dávka BPA, které je tělo ovcí vystaveno v tomto experimentu, odpovídá množství v lidské pupečnickové krvi (Kosarac et al., 2012) i v mateřské moči (shrnuto v Vandenberg et al., 2010), a proto je možné tento výzkum považovat za alespoň částečně relevantní i pro člověka (Veiga-Lopez et al., 2013).

3. Způsoby eliminace účinků BPA

Protože BPA je opravdu všudypřítomný (Corrales et al., 2015) a lidskému organismu zjevně škodí (viz výše), je určitě na místě zamyslet se nad tím, jak jeho působení zabránit i jinak než pouhým zákazem používání.

Významnou prací, která navrhuje, jak řešit vliv všudypřítomného BPA na lidský organismus je studie autorů Dolinoy et al., 2007 (už jsme ji zmiňovali v kapitole 2.3.1.1 Metylace DNA). Bylo v ní totiž zjištěno, že když byly matkám A^{vy} myši podávány ve stravě spolu s BPA donory metylové skupiny (kyselina listová, vitamin B₁₂, betain a cholin chlorid) nebo fytoestrogen genistein, potomci těchto matek vykazovali distribuci barvy srsti stejnou jako jedinci kontrolní, tedy ti, jejichž matky BPA (ani donory metylové skupiny, ani genistein) ve stravě nedostávaly (Dolinoy et al., 2007). Z toho autoři článku vyvozují, že podávání donoru metylové skupiny nebo genisteinu ve stravě matkám ochránilo jejich potomky před hypometylací jejich genomu skrze vliv BPA. Stejný postup bychom mohli potenciálně aplikovat i na úrovni lidské populace, a ochránit ji tak před vlivem všudypřítomného BPA na náš (epi-)genom. Podstatné je také to, že vliv obohacení stravy o donory metylové skupiny přetrvává u A^{vy} myši po generace, protože donory metylové skupiny působí epigenetické změny přímo v zárodečné linii (Cropley et al., 2006). Na základě tohoto faktu autoři Dolinoy et al., 2007 uzavírají, že by podávání metylových donorů ve stravě *in utero* či možná i v dospělosti mohlo chránit lidské zdraví po více generací (zřejmě by ovšem účinnost této preventivní terapie záležela také (nepřímo úměrně) na množství přijatého BPA).

Dále bylo prokázáno, že BPA působí jako adipogenní činidlo a akceleruje diferenciaci 3T3-L1 buněk (Masuno et al., 2005). BPA působí zvýšení exprese mRNA a proteinů PPAR γ , C/EBP α a adiponektinu (Xie et al., 2016).

MicroRNA-21a-5p (miR-21a-5p) podporuje diferenciaci adipocytů (je exprimována v jejím průběhu ve zvýšeném množství) a zvyšuje expresi adiponektinu inhibicí AP-1 (Kang et al., 2013). Ve studii (Xie et al., 2016) ovšem ukázali, že množství miR-21a-5p pokleslo v průběhu diferenciaci 3T3-L1 buněk ošetřených BPA. Dalším experimentem (transfekcí molekul podobných této miRNA, viz Xie et al., 2016) bylo objeveno, že miR-21a-5p inhibuje diferenciaci indukovanou BPA (inhibice zvýšení exprese PPAR γ , C/EBP α a adiponektinu, viz výše) což je efekt zcela opačný vůči tomu, jak ovlivňuje adipocytární diferenciaci tato miRNA bez působení BPA. Zvýšení exprese této miRNA výrazně snížilo množství červených tukových kapének a triglyceridů (Xie et al., 2016). Dále se ukázalo, že nárůst exprese miR-21a-5p vedl k poklesu nadbytečné tělesné hmotnosti a tukové hmoty (Xie et al., 2016). Navíc hladiny celkového cholesterolu, triglyceridů a nízkodenzitního lipoproteinu v séru byly sníženy po injekci molekul podobných miR-21a-5p (Xie et al., 2016). Z toho všeho vyplývá, že zvýšení exprese miR-21a-5p alespoň částečně inhibuje obezitu způsobenou BPA, a mohlo by být potenciálně i využíváno terapeuticky.

Zaměříme se nyní ovšem na konkrétní mechanismus inhibice obezity indukované BPA, kterou způsobuje miR-21a-5p (Xie et al., 2016). Tento mechanismus je poměrně komplexní. Připomeňme si, že BPA podporuje v 3T3-L1 buňkách jejich diferenciaci (Masuno et al., 2005), a tedy vznik tukové tkáně, a potenciálně na úrovni organismu i vznik obezity. Tento efekt tlumí miR-21a-5p (Xie et al., 2016) (za nepřítomnosti vlivu BPA ovšem naopak diferenciaci podporuje, viz výše, Kang et al., 2013).

Adipogenezi stimulují glukokortikoidy (Hauner et al., 1989), přesněji zvýšení transkripční aktivity glukokortikoidního receptoru (GR) podporuje adipogenezi (Sargis et al., 2010). A tuto transkripční aktivitu může inhibovat i aktivovat jeho fosforylace (konkrétně fosforylace S203, S21a-5p1 a S226 (což odpovídá S21a-5p2, S220 a S234 u myši)) (shrnutí v Ismaili & Garabedian, 2004). Zatím ovšem není jasný vliv BPA na tuto GR fosforylaci. Co se ale ví, je, že zvýšení exprese miR-21a-5p inhibuje tuto fosforylaci i GR transkripční aktivitu i klíčový protein MKK3 (ne na úrovni mRNA) (Xie et al., 2016). Co je to za protein a jak ho miR-21a-5p reguluje? Jde o protein z rodiny serin threoninových kináz zvaných MAP kinázy (mitogen-activated protein kinases). V odpovědi na některé signály MKK3 aktivuje jinou kinázu z této rodiny MAP kináz, a to p38 (shrnutí v Cuadrado & Nebreda, 2010), která, pokud aktivována (její aktivace byla pozorována v 3T3-L1 buňkách ošetřených BPA), reguluje fosforylaci GR (shrnutí v Gregoire et al., 1998). A jak je MKK3 regulován miR-21a-5p? Tato miRNA má totiž za svůj přímý cíl gen pro MKK3, který se jmenuje map2k3 (Xu et al., 2013). A pokud jsem tento komplexní mechanismus správně pochopil, tak zde můžeme pozorovat pozitivní zpětnou vazbu. Zvýšení exprese map2k3, a potažmo tedy MKK3, tlumí totiž efekt miR-21a-5p na diferenciaci 3T3-L1 buněk (tento efekt je za přítomnosti BPA inhibiční, bez něj stimulační, viz výše, Xie et al., 2016). Je-li tedy BPA přítomen, pak zvýšení exprese miR-21a-5p znamená větší utlumení exprese map2k3, a tudíž méně tlumení inhibičního efektu miR-21a-5p na diferenciaci adipocytů (3T3-L1 buněk).

Když se pokusíme výsledky studie (Xie et al., 2016) shrnout, tak miR-21a-5p v 3T3-L1 buňkách inhibuje diferenciaci adipocytů indukovanou BPA zacílením na map2k3, a tedy skrze MKK3/p38/MAPK. Jinými slovy miR-21a-5p inhibuje aktivaci GR způsobenou BPA (autoři studie Xie et al., 2016 se tedy vyslovují pro aktivační vliv BPA na GR) skrze inhibici p38/MAPK dráhy, a to cílováním map2k3. A tato inhibice by mohla nabývat, jak bylo zmíněno výše, terapeutického účelu při léčbě obezity indukované BPA.

4. Diskusní poznámka

Můj vlastní pohled na bezpečnost či nebezpečnost BPA se po studiu vědecké literatury přiklání spíše k názoru vědců nežli ke stanovisku odpovědných regulačních úřadů (viz úvodní kapitola) a považoval bych proto za vhodné, aby bylo toto téma více popularizováno a zmiňované regulační úřady hnány širokou (ne pouze vědeckou) veřejností k razantnějším restrikcím. Je možné, že za současným vlažným postojem těchto orgánů stojí průmyslová lobby, viz výše. Ani já si ovšem nejsem zcela jist, zda jsem prostudoval literatury dost, navíc celá tato práce (postavená na kombinaci epidemiologických – korelačních a molekulárních – mechanistických studií) je plná opatrných formulací jako „může způsobovat“ a „je pravděpodobné, že BPA“, a tedy si téma žádá další pozornosti a dalšího výzkumu.

Dotkněme se nyní ještě jednoho tématu, které prací také prochází, a to je, která životní období lidí je vůči vlivu BPA nejcitlivější. Když poznatky v celé práci obsažené jednoduše shrneme, tak nám z toho jednoznačně vychází, že čím mladší jedinec je, tím je k vlivu BPA náchylnější. Za nejcitlivější období považuje většina mnou studovaných autorů období pre-/perinatální, a proto by se BPA měly vyhýbat zvláště těhotné ženy a děti.

5. Závěr

V této práci jsme se pokusili shrnout mechanismy působení bisfenolu A na člověka se zaměřením na obezitu a plodnost. Práce ale není vyčerpávajícím popisem všech známých mechanismů, nevěnoval jsem se totiž záměrně působení BPA přes transkripční faktory.

Ukazuje však, jak BPA interaguje s některými receptory. Je xenoestrogen - váže se na estrogenový receptor a podporuje tak např. vznik obezity. Dále se uplatňuje ve vazbě na receptor GPR30, kde spouští negenomickou (rychlou) signalizační dráhu. Ve vztahu antagonismu je BPA s androgenovým receptorem, a pravděpodobně tak negativně ovlivňuje mužskou reprodukci. Méně jednoznačný je jeho vztah s glukokortikoidním receptorem a receptorem pro hormony štítné žlázy, zvláště u těchto dvou je potřeba dalšího výzkumu.

Dále jsme se zabývali vlivem BPA na syntézu enzymů související s reprodukcí, ani tam nebyly výsledky shrnovaných prací zcela jednoznačné.

A konečně jsme se věnovali i epigenetickým mechanismům působení BPA, které se ukázaly jako relativně komplexní. BPA má vliv na metylaci DNA i expresi miRNA, a tak ovlivňuje v těle řadu procesů.

Dle mého soudu nejzajímavější částí práce je pak kapitola o možnostech negace účinků BPA v lidském organismu. Jednou cestou by mohlo být podávání metylových donorů či genisteinu ve stravě, další inhibice obezitogenních účinků BPA za pomoci miR-21a-5p.

Právě další studium mechanismů působení BPA je nutné, jednak kvůli návrhům způsobů, jak účinkům BPA zamezit, a jednak kvůli ještě většímu množství nikoliv epidemiologických, ale mechanistických (řekněme skoro kauzálních) důkazů o nebezpečnosti BPA, které snad konečně přiměje regulační orgány i veřejnost k akci.

Seznam zkratek

miRNA	microRNA
BPA	bisphenol A
GPR30	G protein-coupled receptor 30
ER α / ER β	estrogen receptor α/β
AR	androgen receptor
DHT	dihydrotestosterone
Hsp90	90-kDa heat shock protein
GR	glucocorticoid receptor
aP2	adipocytový protein 2
TR	thyroid hormone receptor
T3	triiodothyronine
TH	thyroid hormone
HHG	hypotalamus–hypofýza–gonády
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
FSH	follicle-stimulating hormone
PDE4D4	phosphodiesterase type 4 subtype 4
<i>A^{vy}</i>	Agouti viable yellow
DNMTs	DNA methyltransferases
ERE	estrogen response element
<i>MEST</i>	mesoderm-specific transcript
SOX	Sry-related high-mobility-group box
RISC	RNA induced silencing complex
MAP kinázy	mitogen-activated protein kinases

Zdroje

* vyznačuje sekundární citace

URL1: Bisphenol-A-Skeletal.svg In: Wikimedia.org [online]. [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/61/Bisphenol-A-Skeletal.svg>

URL2: Estradiol.svg In: Wikimedia.org [online]. [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/00/Estradiol.svg>

URL3: EU court confirms BPA as substance of ‘very high concern’ In: ehn.org [online]. [cit. 2021-12-12]. Dostupné z: <https://www.ehn.org/bisphenol-a-2639174350.html>

URL4: COMMISSION DIRECTIVE 2011/8/EU of 28 January 2011 amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of Bisphenol A in plastic infant feeding bottles In: eur-lex.europa.eu [online]. [cit. 2021-12-12]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:EN:PDF>

URL5: Bisphenol A In: echa.europa.eu [online]. [cit. 2021-12-12]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/hot-topics/bisphenol-a>

URL6: 2014 Updated safety assessment of Bisphenol A (BPA) for use in food contact applications. In: fda.gov [online]. [cit. 2021-12-12]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/media/90124/download>

URL7: Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application In: fda.gov [online]. [cit. 2021-12-12]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/bisphenol-bpa-use-food-contact-application>

URL8: Mechanism of Action and Physiologic Effects of Thyroid Hormones In: vivo.colostate.edu [online]. [cit. 2021-12-18]. Dostupné z: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/thyroid/physio.html>

URL9: MicroRNA expression profiles in premature ovarian failure patients and its potential regulate functions In: en.cnki.com.cn [online]. [cit. 2021-12-21]. Dostupné z: https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotat-ZYYA201105010.htm

URL10: Global Bisphenol A Market Report 2018: Analysis 2013-2017 & Forecasts 2018-2023 In: prnewswire.com [online]. [cit. 2021-12-31]. Dostupné z: <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-bisphenol-a-market-report-2018-analysis-2013-2017--forecasts-2018-2023-300757673.html>

- Alonso-Magdalena, P., Laribi, O., Ropero, A. B., Fuentes, E., Ripoll, C., Soria, B., & Nadal, A. (2005). Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca²⁺ signals in pancreatic α -cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. *Environmental Health Perspectives*, *113*(8), 969–977. <https://doi.org/10.1289/ehp.8002>
- Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., & Nadal, A. (2010). Bisphenol a exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental Health Perspectives*, *118*(9), 1243–1250. <https://doi.org/10.1289/EHP.1001993>
- Anderson, O. S., Nahar, M. S., Faulk, C., Jones, T. R., Liao, C., Kannan, K., Weinhouse, C., Rozek, L. S., & Dolinoy, D. C. (2012). Epigenetic responses following maternal dietary exposure to physiologically relevant levels of bisphenol A. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *53*(5), 334–342. <https://doi.org/10.1002/em.21692>
- Angle, B. M., Do, R. P., Ponzi, D., Stahlhut, R. W., Drury, B. E., Nagel, S. C., Welshons, W. V., Besch-Williford, C. L., Palanza, P., Parmigiani, S., vom Saal, F. S., & Taylor, J. A. (2013). Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): Evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reproductive Toxicology*, *42*, 256–268. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.07.017>
- Atlas, E., Pope, L., Wade, M. G., Kawata, A., Boudreau, A., & Boucher, J. G. (2014). Bisphenol A increases p2 expression in 3T3L1 by enhancing the transcriptional activity of nuclear receptors at the promoter. *Adipocyte*, *3*(3), 170–179. <https://doi.org/10.4161/adip.28436>
- Bastos Sales, L., Kamstra, J. H., Ceniñ, P. H., van Rijt, L. S., Hamers, T., & Legler, J. (2013). Effects of endocrine disrupting chemicals on in vitro global DNA methylation and adipocyte differentiation. *Toxicology in Vitro*, *27*(6), 1634–1643. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2013.04.005>
- *Ben-Jonathan, N., Hugo, E. R., & Brandebourg, T. D. (2009). Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 304, Issues 1–2, pp. 49–54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.022>

- Bromer, J. G., Zhou, Y., Taylor, M. B., Doherty, L., & Taylor, H. S. (2010). Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *The FASEB Journal*, *24*(7), 2273–2280. <https://doi.org/10.1096/FJ.09-140533>
- Carless, M. A., Kulkarni, H., Kos, M. Z., Charlesworth, J., Peralta, J. M., Göring, H. H. H., Curran, J. E., Almasy, L., Dyer, T. D., Comuzzie, A. G., Mahaney, M. C., & Blangero, J. (2013). Genetic Effects on DNA Methylation and Its Potential Relevance for Obesity in Mexican Americans. *PLOS ONE*, *8*(9), e73950. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0073950>
- Carrigan, A., Walther, R. F., Salem, H. A., Wu, D., Atlas, E., Lefebvre, Y. A., & Haché, R. J. G. (2007). An Active Nuclear Retention Signal in the Glucocorticoid Receptor Functions as a Strong Inducer of Transcriptional Activation. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(15), 10963–10971. <https://doi.org/10.1074/JBC.M602931200>
- *Cimmino, I., Fiory, F., Perruolo, G., Miele, C., Beguinot, F., Formisano, P., & Oriente, F. (2020). Potential mechanisms of bisphenol a (BPA) contributing to human disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 16, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21165761>
- Corrales, J., Kristofco, L. A., Steele, W. B., Yates, B. S., Breed, C. S., Williams, E. S., & Brooks, B. W. (2015). *Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation*. <https://doi.org/10.1177/1559325815598308>
- Cropley, J. E., Suter, C. M., Beckman, K. B., & Martin, D. I. K. (2006). Germ-line epigenetic modification of the murine Avy allele by nutritional supplementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(46), 17308–17312. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0607090103>
- *Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, *429*(3), 403–417. <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>
- Daftary, G. S., & Taylor, H. S. (2000). Implantation in the human: The role of HOX genes. In *Seminars in Reproductive Medicine* (Vol. 18, Issue 3, pp. 311–320). Semin Reprod Med. <https://doi.org/10.1055/s-2000-12568>
- Davis-Dusenbery, B. N., & Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis.

The Journal of Biochemistry, 148(4), 381–392. <https://doi.org/10.1093/JB/MVQ096>

Day, K., Waite, L. L., Thalacker-Mercer, A., West, A., Bamman, M. M., Brooks, J. D., Myers, R. M., & Absher, D. (2013). Differential DNA methylation with age displays both common and dynamic features across human tissues that are influenced by CpG landscape. *Genome Biology*, 14(9), R102. <https://doi.org/10.1186/GB-2013-14-9-R102>

Dodds, E. C., & Lawson, W. (1936). Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature 1936 137:3476*, 137(3476), 996–996. <https://doi.org/10.1038/137996a0>

Dolinoy, D. C., Huang, D., & Jirtle, R. L. (2007). Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(32), 13056–13061. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703739104>

*Du, H., & Taylor, H. S. (2004). Molecular regulation of Müllerian development by Hox genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1034, 152–165. <https://doi.org/10.1196/annals.1335.018>

El Hajj, N., Pliushch, G., Schneider, E., Dittrich, M., Müller, T., Korenkov, M., Aretz, M., Zechner, U., Lehnen, H., & Haaf, T. (2013). Metabolic Programming of MEST DNA Methylation by Intrauterine Exposure to Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes*, 62(4), 1320–1328. <https://doi.org/10.2337/DB12-0289>

Fang, H., Tong, W., Branham, W. S., Moland, C. L., Dial, S. L., Hong, H., Xie, Q., Perkins, R., Owens, W., & Sheehan, D. M. (2003). Study of 202 Natural, Synthetic, and Environmental Chemicals for Binding to the Androgen Receptor. *Chemical Research in Toxicology*, 16(10), 1338–1358. <https://doi.org/10.1021/tx030011g>

Flamant, F., Baxter, J. D., Forrest, D., Refetoff, S., Samuels, H., Scanlan, T. S., Vennström, B., & Samarut, J. (2006). International Union of Pharmacology. LIX. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Thyroid Hormone Receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 705–711. <https://doi.org/10.1124/PR.58.4.3>

*Gelman, E. (2002). Molecular Biology of the Androgen Receptor. *Article in Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.10.018>

*Gorini, F., Bustaffa, E., Coi, A., Iervasi, G., & Bianchi, F. (2020). Bisphenols as Environmental Triggers of Thyroid Dysfunction: Clues and Evidence. *International*

Journal of Environmental Research and Public Health 2020, Vol. 17, Page 2654, 17(8), 2654. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17082654>

*Gregoire, F. M., Smas, C. M., & Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*, 78(3), 783–809. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1998.78.3.783/ASSET/IMAGES/LARGE/JNP.JY09F1.JPEG>

Hauer, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., & Pfeiffer, E. F. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *Journal of Clinical Investigation*, 84(5), 1663. <https://doi.org/10.1172/JCI114345>

He, Y., Miao, M., Wu, C., Yuan, W., Gao, E., Zhou, Z., & Li, D.-K. (2009). Occupational Exposure Levels of Bisphenol A among Chinese Workers. *Journal of Occupational Health*, 51(5), 0908110094–0908110094. <https://doi.org/10.1539/JOH.O9006>

Ho, S.-M., Tang, W.-Y., Belmonte De Frausto, J., & Prins, G. S. (2006). Developmental Exposure to Estradiol and Bisphenol A Increases Susceptibility to Prostate Carcinogenesis and Epigenetically Regulates Phosphodiesterase Type 4 Variant 4. *Cancer Res*, 66(11), 5624–5656. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0516>

Huang, X., Cang, X., & Liu, J. (2019). Molecular mechanism of Bisphenol A on androgen receptor antagonism. *Toxicology in Vitro*, 61, 104621. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104621>

Hugo, E. R., Brandebourg, T. D., Woo, J. G., Loftus, J., Alexander, J. W., & Ben-Jonathan, N. (2008). Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environmental Health Perspectives*, 116(12), 1642–1647. <https://doi.org/10.1289/EHP.11537>

Ismaili, N., & Garabedian, M. J. (2004). Modulation of Glucocorticoid Receptor Function via Phosphorylation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024(1), 86–101. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1321.007>

Junge, K. M., Leppert, B., Jahreis, S., Wissenbach, D. K., Feltens, R., Grützmann, K., Thürmann, L., Bauer, T., Ishaque, N., Schick, M., Bewerunge-Hudler, M., Röder, S., Bauer, M., Schulz, A., Borte, M., Landgraf, K., Körner, A., Kiess, W., von Bergen, M., ... Lehmann, I. (2018). MEST mediates the impact of prenatal bisphenol A exposure on long-

- term body weight development. *Clinical Epigenetics*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13148-018-0478-Z/FIGURES/5>
- Kadota, Y., Kawakami, T., Suzuki, S., & Sato, M. (2009). Involvement of Mesoderm-specific Transcript in Cell Growth of 3T3-L1 Preadipocytes. *Journal of Health Science*, 55(5), 814–819. <https://doi.org/10.1248/JHS.55.814>
- Kaiser, U. B., & Kuohung, W. (2005). KiSS-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. *Endocrine* 2005 26:3, 26(3), 277–284. <https://doi.org/10.1385/ENDO:26:3:277>
- Kamei, Y., Suganami, T., Kohda, T., Ishino, F., Yasuda, K., Miura, S., Ezaki, O., & Ogawa, Y. (2007). Peg1/Mest in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner. *FEBS Letters*, 581(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.12.002>
- Kang, M., Yan, L. M., Zhang, W. Y., Li, Y. M., Tang, A. Z., & Ou, H. S. (2013). Role of microRNA-21 in regulating 3T3-L1 adipocyte differentiation and adiponectin expression. *Molecular Biology Reports*, 40(8), 5027–5034. <https://doi.org/10.1007/S11033-013-2603-6/FIGURES/7>
- Ke, Z. H., Pan, J. X., Jin, L. Y., Xu, H. Y., Yu, T. T., Ullah, K., Rahman, T. U., Ren, J., Cheng, Y., Dong, X. Y., Sheng, J. Z., & Huang, H. F. (2016). Bisphenol A Exposure May Induce Hepatic Lipid Accumulation via Reprogramming the DNA Methylation Patterns of Genes Involved in Lipid Metabolism. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep31331>
- Kiefer, J. C. (2007). Back to basics: Sox genes. *Developmental Dynamics*, 236(8), 2356–2366. <https://doi.org/10.1002/DVDY.21218>
- Kim, J. Y., Han, E. H., Kim, H. G., Oh, K. N., Kim, S. K., Lee, K. Y., & Jeong, H. G. (2010). Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular Leydig cells. *Toxicology Letters*, 193(2), 200–208. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2010.01.011>
- Klinge, C. (2009). Estrogen Regulation of MicroRNA Expression. *Current Genomics*, 10(3), 169–183. <https://doi.org/10.2174/138920209788185289>
- *Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic*

Acids Research, 29(14), 2905. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.14.2905>

Klinge, Carolyn M. (2015). miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 418, Issue 0 3, pp. 273–297). Mol Cell Endocrinol. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.035>

Kojima, H., Takeuchi, S., Sanoh, S., Okuda, K., Kitamura, S., Uramaru, N., Sugihara, K., & Yoshinari, K. (2019). Profiling of bisphenol A and eight its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicology*, 413, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.12.001>

*Koryakina, Y., Ta, H. Q., & Gioeli, D. (2014). Androgen receptor phosphorylation: Biological context and functional consequences. In *Endocrine-Related Cancer* (Vol. 21, Issue 4, pp. T131–T145). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0472>

Kosarac, I., Kubwabo, C., Lalonde, K., & Foster, W. (2012). A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 898, 90–94. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2012.04.023>

Kuiper, G. G. J. M., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., Van Der Saag, P. T., Van Der Burg, B., & Gustafsson, J. Å. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, 139(10), 4252–4263. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>

*Kuohung, W., & Kaiser, U. B. (2007). GPR54 and KiSS-1: Role in the regulation of puberty and reproduction. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2007 7:4, 7(4), 257–263. <https://doi.org/10.1007/S11154-006-9020-2>

Kwintkiewicz, J., Nishi, Y., Yanase, T., & Giudice, L. C. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. *Environmental Health Perspectives*, 118(3), 400–406. <https://doi.org/10.1289/EHP.0901161>

*Legeay, S., & Faure, S. (2017). Is bisphenol A an environmental obesogen? *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 31(6), 594–609. <https://doi.org/10.1111/FCP.12300>

- Li, B., Lu, W., & Chen, Z. (2014). Regulation of Androgen Receptor by E3 Ubiquitin Ligases: for More or Less. *Receptors & Clinical Investigation*, 1(5). <https://doi.org/10.14800/RCI.122>
- Liu, Y., Wang, Y., Wang, F., Pan, J., Xu, J., Li, J., Zhou, C., Ding, G., Wu, Y., Liu, X., Sheng, J., & Huang, H. (2018). Mechanism underlying the retarded nuclear translocation of androgen receptor splice variants. *Science China Life Sciences* 2018 62:2, 62(2), 257–267. <https://doi.org/10.1007/S11427-018-9379-X>
- Manfo, F. P. T., Jubendradass, R., Nantia, E. A., Moundipa, P. F., & Mathur, P. (2014). Adverse effects of bisphenol a on male reproductive function. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 228, 57–82. https://doi.org/10.1007/978-3-319-01619-1_3
- Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P. G. P., & Mselli-Lakhal, L. (2012). Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(2), 395–407. <https://doi.org/10.1002/HEP.24685>
- Marmugi, A., Lasserre, F., Beuzelin, D., Ducheix, S., Huc, L., Polizzi, A., Chetivaux, M., Pineau, T., Martin, P., Guillou, H., & Mselli-Lakhal, L. (2014). Adverse effects of long-term exposure to bisphenol A during adulthood leading to hyperglycaemia and hypercholesterolemia in mice. *Toxicology*, 325, 133–143. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2014.08.006>
- Masuno, H., Iwanami, J., Kidani, T., Sakayama, K., & Honda, K. (2005). Bisphenol A Accelerates Terminal Differentiation of 3T3-L1 Cells into Adipocytes through the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *Toxicological Sciences*, 84(2), 319–327. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFI088>
- Mays-Hoopes, L., Chao, W., Butcher, H. C., & Huang, R. C. C. (1986). Decreased methylation of the major mouse long interspersed repeated DNA during aging and in myeloma cells. *Developmental Genetics*, 7(2), 65–73. <https://doi.org/10.1002/DVG.1020070202>
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., & Nakao, K. (2002). Thyroid Hormone Action Is Disrupted by Bisphenol A as an Antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*,

87(11), 5185–5190. <https://doi.org/10.1210/JC.2002-020209>

- Nadal, A., Ropero, A. B., Laribi, O., Maillet, M., Fuentes, E., & Soria, B. (2000). Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor α and estrogen receptor β . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11603–11608. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11603>
- Ni, L., Llewellyn, R., Kesler, C. T., Kelley, J. B., Spencer, A., Snow, C. J., Shank, L., & Paschal, B. M. (2013). Androgen Induces a Switch from Cytoplasmic Retention to Nuclear Import of the Androgen Receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 33(24), 4766–4778. <https://doi.org/10.1128/MCB.00647-13>
- Noguchi, S., Nakatsuka, M., Asagiri, K., Habara, T., Takata, M., Konishi, H., & Kudo, T. (2002). Bisphenol A stimulates NO synthesis through a non-genomic estrogen receptor-mediated mechanism in mouse endothelial cells. *Toxicology Letters*, 135(1–2), 95–101. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00252-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00252-7)
- Nothnick, W. B., Healy, C., & Hong, X. (2010). Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1. *Endocrine* 2009 37:2, 37(2), 265–273. <https://doi.org/10.1007/S12020-009-9293-9>
- Nunez-Iglesias, J., Liu, C.-C., Morgan, T. E., Finch, C. E., & Zhou, X. J. (2010). Joint Genome-Wide Profiling of miRNA and mRNA Expression in Alzheimer's Disease Cortex Reveals Altered miRNA Regulation. *PLOS ONE*, 5(2), e8898. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008898>
- Peretz, J., Gupta, R. K., Singh, J., Hernández-Ochoa, I., & Flaws, J. A. (2011). Bisphenol A Impairs Follicle Growth, Inhibits Steroidogenesis, and Downregulates Rate-Limiting Enzymes in the Estradiol Biosynthesis Pathway. *Toxicological Sciences*, 119(1), 209–217. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFQ319>
- Phrakonkham, P., Viengchareun, S., Belloir, C., Lombès, M., Artur, Y., & Canivenc-Lavier, M. C. (2008). Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 110(1–2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.02.006>
- Rubin, B. S., Paranjpe, M., DaFonte, T., Schaeberle, C., Soto, A. M., Obin, M., & Greenberg, A. S. (2017). Perinatal BPA exposure alters body weight and composition in a dose

specific and sex specific manner: The addition of peripubertal exposure exacerbates adverse effects in female mice. *Reproductive Toxicology*, 68, 130–144. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.07.020>

Salami, J., Alabi, S., Willard, R. R., Vitale, N. J., Wang, J., Dong, H., Jin, M., McDonnell, D. P., Crew, A. P., Neklesa, T. K., & Crews, C. M. (2018). Androgen receptor degradation by the proteolysis-targeting chimera ARCC-4 outperforms enzalutamide in cellular models of prostate cancer drug resistance. *Communications Biology* 2018 1:1, 1(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0105-8>

Sargis, R. M., Johnson, D. N., Choudhury, R. A., & Brady, M. J. (2010). Environmental Endocrine Disruptors Promote Adipogenesis in the 3T3-L1 Cell Line through Glucocorticoid Receptor Activation. *Obesity*, 18(7), 1283–1288. <https://doi.org/10.1038/OBY.2009.419>

Savabieasfahani, M., Kannan, K., Astapova, O., Evans, N. P., & Padmanabhan, V. (2006). Developmental Programming: Differential Effects of Prenatal Exposure to Bisphenol-A or Methoxychlor on Reproductive Function. *Endocrinology*, 147(12), 5956–5966. <https://doi.org/10.1210/EN.2006-0805>

Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M., & Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol a accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives*, 110(11). <https://doi.org/10.1289/EHP.110-1241091>

*Serini, V. (2000). Polycarbonates. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. https://doi.org/10.1002/14356007.A21_207

Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Hastay, A. H., Osuga, J. I., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., Gotoda, T., Ishibashi, S., & Yamada, N. (1999). Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 as a Key Transcription Factor for Nutritional Induction of Lipogenic Enzyme Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35832–35839. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.50.35832>

Sirotkin, A. V., Ovcharenko, D., Grossmann, R., Lauková, M., & Mlynček, M. (2009). Identification of MicroRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *Journal of Cellular Physiology*, 219(2), 415–420. <https://doi.org/10.1002/JCP.21689>

Sohoni, P., & Sumpter, J. P. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens.

Journal of Endocrinology, 158(3), 327–339. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1580327>

Soubry, A., Murphy, S. K., Wang, F., Huang, Z., Vidal, A. C., Fuemmeler, B. F., Kurtzberg, J., Murtha, A., Jirtle, R. L., Schildkraut, J. M., & Hoyo, C. (2013). Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes. *International Journal of Obesity* 2015 39:4, 39(4), 650–657. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.193>

*Srinivas-Shankar, U., & Wu, F. C. (2006). Drug Insight: testosterone preparations. *Nature Clinical Practice Urology* 2006 3:12, 3(12), 653–665. <https://doi.org/10.1038/ncpuro0650>

Takahashi, M., Kamei, Y., & Ezaki, O. (2005). Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 288(1 51-1), 117–124. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00244.2004/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH10010519330006.JPEG>

*Tan, M. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., & Yong, E. (2014). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* 2015 36:1, 36(1), 3–23. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>

Trasande, L., Attina, T. M., & Blustein, J. (2012). Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA*, 308(11), 1113–1121. <https://doi.org/10.1001/2012.JAMA.11461>

*Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F. J. R., & Schoenfelder, G. (2010). Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 118(8), 1055–1070. <https://doi.org/10.1289/EHP.0901716>

Veiga-Lopez, A., Luense, L. J., Christenson, L. K., & Padmanabhan, V. (2013). Developmental Programming: Gestational Bisphenol-A Treatment Alters Trajectory of Fetal Ovarian Gene Expression. *Endocrinology*, 154(5), 1873–1884. <https://doi.org/10.1210/EN.2012-2129>

*Welshons, W. V., Nagel, S. C., & Vom Saal, F. S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 147(6 Suppl). <https://doi.org/10.1210/EN.2005-1159>

*Welshons, W. V., Thayer, K. A., Judy, B. M., Taylor, J. A., Curran, E. M., & vom Saal, F. S.

- (2003). Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives*, 111(8), 994. <https://doi.org/10.1289/EHP.5494>
- Wilson, V. L., Smith, R. A., Ma, S., & Cutler, R. G. (1987). Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *Journal of Biological Chemistry*, 262(21), 9948–9951. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)61057-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61057-9)
- Xi, W., Lee, C. K. F., Yeung, W. S. B., Giesy, J. P., Wong, M. H., Zhang, X., Hecker, M., & Wong, C. K. C. (2011). Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus–pituitary–gonadal axis of CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*, 31(4), 409–417. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2010.12.002>
- Xie, X., Song, J., & Li, G. (2016). MiR-21a-5p suppresses bisphenol A-induced pre-adipocyte differentiation by targeting map2k3 through MKK3/p38/MAPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(1), 140–146. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.03.066>
- Xu, G., Zhang, Y., Wei, J., Jia, W., Ge, Z., Zhang, Z., & Liu, X. (2013). MicroRNA-21 promotes hepatocellular carcinoma HepG2 cell proliferation through repression of mitogen-activated protein kinase-kinase 3. *BMC Cancer*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-469/FIGURES/5>
- *Yilmaz, B., Terekeci, H., Sandal, S., & Kelestimur, F. (2019). Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2019 21:1, 21(1), 127–147. <https://doi.org/10.1007/S11154-019-09521-Z>