

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Rizikové látky uvolňující se z plastových lahví

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Vopršálová, CSc.

Hradec Králové 2013

Iveta Najmanová

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání stejného či jiného titulu.“

V Hradci Králové dne 10.5.2013

.....

Iveta Najmanová

„Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce PharmDr. Marii Vopršálové, CSc., za vstřícný přístup, cenné rady a připomínky při psaní diplomové práce. Poděkování patří i mé rodině za podporu při psaní práce.“

Abstrakt v českém jazyce

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Iveta Najmanová

Školitel: PharmDr. Marie Vopršálová, CSc.

Název diplomové práce: Rizikové látky uvolňující se z plastových lahví

Diplomová práce je zaměřena na rizikové látky, které se uvolňují z plastových lahví. Pozornost je věnována zejména bisfenolu A a antimonu a jejich účinkům po orálním podání. Vzhledem k tomu, že se jedná o látky pro člověka škodlivé, byla většina informací o jejich působení zjištěna při epidemiologických studiích nebo studiích na laboratorních zvířatech a lidských tkáních. Diplomová práce dokumentuje toxikologické účinky na organismus, a to zejména bisfenolu A. V menším rozsahu se zabývá vlivem antimonu, a to z důvodu omezeného počtu studií na toto téma. Jedná se o rešeršní diplomovou práci, údaje jsou souhrnem bibliografických záznamů na dané téma.

Abstrakt v anglickém jazyce

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Iveta Najmanová

Supervisor: PharmDr. Marie Vopršálová, CSc.

Title of diploma thesis: Hazardous substances that are released from plastic bottles

This master thesis focuses on hazardous substances that are released from plastic bottles. Attention is paid especially to bisphenol A and antimony and their effects after oral administration. Given the fact that these substances are harmful to humans, most of the information about their effects was observed in epidemiological studies or studies conducted on laboratory animals and human tissues. The thesis documents the toxicological effects on the body, especially of bisphenol A. To a lesser extent and primarily because of the limited number of studies on this topic, it deals with the influence of antimony. This is a search thesis and the data are the sum of bibliographic records on the subject.

Obsah

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	1
2. ÚVOD A CÍL	4
3. PLASTOVÉ LAHVE	5
3.1. Složení plastových lahví	5
4. BISFENOL A	8
4.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti	9
4.2. Toxicita	11
4.3. Tolerovaný denní příjem	12
4.4. Limity bisfenolu A v lahvích	12
4.5. Endokrinní disruptory	13
4.6. Mechanismus účinku	14
4.6.1. Působení přes receptory	14
4.6.2. Ovlivnění činnosti aromátázy	16
4.6.3. Poškození genetické informace	16
4.7. Farmakokinetika	17
4.7.1. Absorpce	17
4.7.2. Distribuce	17
4.7.3. Metabolismus	19
4.7.4. Exkrece a transportní systém	21
4.7.5. Bisfenol A v mateřském mléce	23
4.7.6. Srovnání účinku BPA a BPA-glukuronidu na estrogenní receptory	23
4.8. Analytické metody pro stanovení BPA v biologickém materiálu	24
4.9. Kojenecké lahve	25
4.9.1. Detekce bisfenolu A v kojeneckých lahvích	25
4.9.2. Uvolňování bisfenolu A při používání lahví	26
4.9.3. Odhad denního příjmu	27
4.10. Epidemiologické studie	29
4.11. Vliv bisfenolu A na organismus	32
4.11.1. Vliv na kardiovaskulární systém	32
4.11.2. Vliv na vývoj mozku	33
4.11.3. Vliv na štítnou žlázu	34

4.11.4.	Vliv na pankreas	35
4.11.5.	Vliv na tukovou tkáň.....	37
4.11.6.	Vliv na imunitu.....	38
4.11.7.	Vliv na samčí pohlavní orgány a produkci spermatu	40
4.11.8.	Vliv na vznik rakoviny prostaty	41
4.11.9.	Vliv na nástup puberty a estrálního cyklu.....	42
4.11.10.	Vliv na vývoj oocytů.....	43
4.11.11.	Vliv na vývoj prsních žláz.....	44
4.11.12.	Vliv na placentu.....	45
5.	ANTIMON.....	47
5.1.	Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	47
5.2.	Toxicita.....	49
5.3.	Tolerovaný denní příjem.....	50
5.4.	Limity antimonu v lahvích.....	50
5.5.	Mechanismus účinku	51
5.6.	Farmakokinetika.....	51
5.6.1.	Absorpce	51
5.6.2.	Distribuce	51
5.6.3.	Metabolismus	51
5.6.4.	Exkrece.....	51
5.7.	Analytické metody pro stanovení antimonu	52
5.8.	Antimon v balené vodě.....	52
5.9.	Vliv na zdraví.....	53
6.	DISKUSE.....	54
7.	ZÁVĚR.....	55
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3T3-L1	buněčná linie fibroblastu – L1
AhR	aryl hydrocarbon receptor
Ar	androgenní receptor
BPA	bisfenol A
CCL1	chemokin ligand 1
CD	CD kmen potkanů Sprague – Dawley
CF	spotřební faktor
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
COX-2	cyklooxygenáza 2
CpG	cytosinguaninové dinukleotidy
DEHP	di-2-ethylhexylftalát
E₂	estradiol
EC₅₀	střední účinná (efektivní) koncentrace
ECD	endokrinní disruptor
EDI	odhadovaný denní příjem (estimated daily intake)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	estrogenní receptor
ERE	estrogen responzivní element
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases 1 a/nebo 2
ERRγ	estrogene related receptor gama
F-344	Fischer 344
FSH	folikulostimulační hormon
f_x	distribuční faktor
GC	guanylyl cyklázy
GC-MS	plynová chromatografie se spektrometrickou detekcí
GPER1	G protein-coupled receptor1= GPR30
HEL	lysozym ze slepičích vajec (henn egg lysozym)
HepG2	linie nádorových buněk jater
HDPE	polyethylen o vysoké hustotě
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
HPLC-FL	vysokotlaká kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí

HSA	lidský sérový albumin
HSP	heat shock protein – protein teplotního šoku
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IgG1	imunoglobulin G 1
IgG2a	imunoglobulin G 2a
IL-1	interleukin 1
IL-4	interleukin 4
IL-10	interleukin 10
INF-γ	interferon- γ
LC	kapalinová chromatografie
LD₅₀	dosis lethalis 50
LDPE	polyethylen o nízké hustotě
LH	luteinizační hormon
LPS	lipopolysacharid
M	koncentrace BPA v obalovém materiálu
MCP-1	monocyte chmoattractant protein-1
mER	membránový estrogenní receptor
MRP	multidrug resistance-associated protein
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
M_x	migrační hodnota
ncmER	non classical membrane ER
N-CoR	jaderný korepresor
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NIH	National Institutes of Health
NK	natural killer
NK-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMU	N-nitroso-N-methylurea
NOAEL	hodnota, při které nebyly pozorovány negativní účinky (no-observed-adverse-effect-level)
NOS	syntáza oxidu dusnatého
Oatp4a1	organic anion-transporting polypeptide 4a1
OFT	open field test
PC	polykarbonát

PDE	fosfodiestráza
PDE4D4	fosfodiestráza 4 varianta 4
PET	polyethylen tereftalát
PKG	protein kináza G
PP	polypropylen
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated recepto
PR	progesteronový receptor
PS	polystyren
PVC	polyvinylchlorid
RC3	neurogranin (protein kinase C substrate)
SC	subkutánní
SML	specifický migrační limit
SULT1A1	sulfotransferása 1A1
T₃	trijodthyronin
T₄	thyroxin
TBG	thyroxin vázající globulin
TDI	tolerovaný denní příjem
Th1	T pomocné buňky typu 1 (T helper cells 1)
Th2	T pomocné buňky typu 2 (T helper cells 2)
TNF-α	tumornekrotizující faktor α
TR	thyroidální receptor
TRH	thyroxin releasing hormone
TSH	thyreotropin
TTR	transthyretin
UDP	uridin difosfát
UGT	uridin difosfát glykosyltransferása
US FDA	U.S. Food and Drug Administration
VIS	viscerální
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
Wnt4	protein kódovaný WNT4 genem (wingless-type MMTV integration site family, member 4)

2. ÚVOD A CÍL

Výroba plastů a zejména plastových lahví je neustále na vzestupu. V roce 2011 stoupla produkce plastů v porovnání s rokem předchozím o 3,7 % a dosáhla neuvěřitelných 280 milionů tun. Z toho je přibližně 2,7 milionů tun plastu použito na výrobu lahví na vodu. (Owen 2006, Plastic - the Facts 2012)

Lidé jsou neustále obklopeni plasty, ale zdravotní rizika jejich používání neznají. Až poměrně nedávno byla problematika plastových lahví medializována a veřejnost se dozvěděla o bisfenolu A, antimonu a dalších látkách obsažených v lahvích.

Bisfenol A je organická sloučenina, která se používá na výrobu polykarbonátových plastových lahví a epoxidových pryskyřic. Těmi se potahují vnitřní části plechovek. Z lahví se bisfenol A uvolňuje ve velmi malém množství, které nepřekračuje tolerovaný denní příjem. Ovšem studie, které se zabývají vlivem bisfenolu A na organismus, potvrzují jeho škodlivé působení i v takto nízkých dávkách. Bisfenol A totiž patří mezi endokrinní disruptory, jejichž účinky se mohou projevit až po delší době od expozice.

Další často diskutovanou látkou je antimon. Používá se jako katalyzátor při polymerizaci polyethylentereftalové kyseliny. Na rozdíl od bisfenolu A se nejedná o endokrinní disruptor a jeho účinek se projeví až po překročení NOAEL (No Observable Adverse Effect Level).

Cílem této diplomové práce je shromáždit dostupné informace o škodlivých látkách, které se uvolňují z plastových lahví, se zaměřením na bisfenol A a antimon a zjistit, v jakých množstvích se uvolňují a jak v těchto dávkách působí na organismus.

3. PLASTOVÉ LAHVE

První plast byl vyroben roku 1862. Z nitrátu celulózy jej vyrobil Alexander Parkes tak, že rozpustil celulózové vlákna v kyselině dusičné. Po přidání kafru roztok odpařil a získal lehce tvarovatelný materiál. Nazval ho parkesin. Tento materiál se používá dodnes, ale už ne na výrobu plastových lahví. Od té doby prodělaly plastické materiály velký vývoj. I nadále jsou pak tyto materiály zdokonalovány, aby výrobky z nich byly lehčí, tenčí a zdravotně nezávadné (<http://inventors.about.com/od/pstartinventions/a/plastics.htm>).

3.1. Složení plastových lahví

Plastové lahve jsou tvořeny nejčastěji těmito polymery:

- polyethyltereftalát (PET),
- polyethylen s vysokou hustotou (High-density polyethylene HDPE),
- polyvinylchlorid (PVC),
- polyethylen o nízké hustotě (Low-density polyethylene LDPE),
- polypropylen (PP),
- polystyren (PS),
- polykarbonát (PC).

Lahve známé pod zkratkou PET jsou vyrobeny z polyethyltereftalátu. Jak už název napovídá, ten vzniká při kondenzaci ethylenglykolu s kyselinou tereftalovou. Z polyethyltereftalátu se vyrábí lahve na mléko, vodu, nealkoholické i alkoholické nápoje, lahve na čisticí prostředky apod. PET lahve mají spoustu předností. Jsou lehké, nerozbitné, průhledné, lehce tvarovatelné a stabilní při teplotách od -60°C do 220°C . Mají však i nevýhody, patří k nim uvolňování některých složek, zejména plastifikátorů, které zajišťují již zmíněnou tvarovatelnost. Nejčastěji diskutovanými látkami, které se uvolňují, je bisfenol A, ftaláty a antimon, který se používá v určitém kroku výroby (Marták 2008, <http://odpady.plzen.eu/mesto-a-odpady/prehled-recyklacnich-znacek.aspx>).

HDPE je polyethylen s vysokou hustotou, také se mu říká tvrdý polyethylen. Na některých výrobcích se setkáme i se značkou PEHD. Vyrábí se polymerací ethylenu za nízkého tlaku a za přítomnosti katalyzátorů. HDPE má lineární molekulu a vysokou molekulovou hmotnost. Jeho výhodou je vysoká mechanická a teplotní odolnost. Lze ho

používat v rozmezí teplot od -40°C až do 110°C . Nepropouští vodu, v malém množství propouští vodní páry a plyny. Je relativně odolný vůči působení chemikálií. Vyrábí se z něj lahve na mléko, olej, čisticí prostředky, víčka od PET lahví, obaly od šampónů a sprchových gelů (Marták 2008, <http://odpady.plzen.eu/mesto-a-odpady/prehled-recyklacnich-znacek.aspx>).

Mezi nejdůležitější polymery, z nichž se vyrábí plastové lahve, patří vinylové polymery. Vznikají polymerací monomerů se základní strukturou $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{R}$, kde R je Cl v případě polyvinylchloridu, nebo fenyl v případě polystyrenu (Marták 2008).

PVC je jedním z nejvíce používaných plastů, hned za polyethylenem a polypropylenem. Jeho chemický název je polychlorethen. Tvoří lineární molekulu, která je místy rozvětvena. Protože je to za surového stavu křehká a nepružná hmota, musí se do ní přidávat určité procento příměsí pro dosažení potřebných vlastností. Mezi tyto látky patří vysokomolekulární plastifikátory a nízkomolekulární změkčovadla. Lahve se vyrábí ze změkčeného PVC, které může obsahovat až 40 % změkčovadel. Dále se přidávají stabilizátory, které zvyšují stabilitu PVC vůči působení světla a tepla. PVC se používá na výrobu lahví na ocet a oleje, sportovní lahve, lahve na čisticí prostředky. PVC lahve se recyklují mechanicky, tedy jiným způsobem než ostatní plasty. Výrobky z PVC by se neměly vyhazovat do žlutých kontejnerů na plasty, ale odvážet přímo do sběrných dvorů (Marták 2008, http://www.tesprahodonin.cz/soubory/jak_spravne_tridit/jak_tridit_plast.pdf).

LDPE je polyethylen s nízkou hustotou. Vyrábí se polymerací ethylenu za vysokého tlaku od 50 do 300 MPa. Jeho molekula je z části rozvětvena a má nižší molekulovou hmotnost než HDPE, chemická odolnost a propustnost je stejná. Tento materiál se hodí na výrobu etiket PET lahví nebo jej najdeme v mačkáčích lahvích na kečup nebo hořčici (Marták 2008, <http://odpady.plzen.eu/mesto-a-odpady/prehled-recyklacnich-znacek.aspx>).

PP (polypropylene) je svými vlastnostmi velmi podobný polyethylenu, ale na rozdíl od něj není průhledný. Jeho velkou výhodou je, že má vysokou teplotu tání. Čistý PP má teplotu tání až 176°C , takže se dá bez problémů sterilizovat. Na rozdíl od PE je více odolný vůči chemikáliím a je také pevnější a tvrdší, ale zase méně odolný vůči mrazu. Používá se hlavně na výrobu fólií. Lahve z PP by byly tříštivé, proto sepropylen kopolymeruje s ethylenem. Jak už bylo zmíněno, pro svou tepelnou odolnost se z něj vyrábí laboratorní sklo. Dále se s ním můžeme setkat v lahvích od kečupu nebo hořčice, v kelímcích nebo se nachází ve víčkách plastových kontejnerů na nápoje.

PS (polystyrene) je jedním z nejdéle známých syntetických polymerů. Vzniká polymerací styrenu. Jeho molekula je méně lineární než PVC a je také křehčí. Dobře propouští vodní páru i kyslík. Je citlivý vůči UV záření a nedolává ani vysokým teplotám nad 70°C. Vyrábí se z něj kelímky, plastové přístroje, plastové nádoby, používá se také jako tepelně-izolační materiál (Marták 2008, <http://odpady.plzen.eu/mesto-a-odpady/prehled-recyklacnich-znacek.aspx>).

Ostatní plasty – jsou vyrobeny z jiných než výše uvedených látek, případně jejich směsí. Patří sem například polykarbonáty (PC). Jedná se o polyestery kyseliny uhličité se symetrickými dihydroxysloučeninami. Ty obsahují dvě fenolická jádra spojená alkylem. Takovou sloučeninou je i bisfenol A. Polakarbonáty jsou velmi odolnými plasty. Vykazují odolnost vůči vysoké teplotě, UV záření a kyselinám. Báze je však poškozují. Propouští vodní páru a plyny. PC jsou průhledné, čiré plasty. Jsou dobře rozpustné v chlorovaných uhlovodících a cyklohexanu a těžce rozpustné v aromatických uhlovodících, ketonech a esterech. Samostatně se při balení potravin nevyužívají, ale bývají součástí koextruze v PP, PVC, PET atd (Marták 2008).

Z hlediska zdraví jsou nejméně bezpečné lahve vyrobené z PVC, PET a PC. Tyto plasty jsou nebezpečné zejména pro své příměsi, které zajišťují jejich dobrou zpracovatelnost a pružnost materiálu. Patří mezi ně především nebezpečný bisfenol A. Ten se uvolňuje v případě, že polymerační proces neproběhl do konce. V plasty je tedy přítomen nevázaný BPA, nebo se uvolňuje při poškození lahve. Výrobky z HDPE, LDPE a PP jsou pokládány za bezpečné. PET lahve, které jsou vyrobeny z polyethylentereftalátu, je možno pokládat za bezpečné pouze v tom případě, že nejsou používány opakovaně. Polyethylentereftalát je v nich vázán pevnou vazbou a z lahví se uvolňuje jen při jejich poškození, rozkladu nebo při spalování (http://environment.about.com/od/healthenvironment/a/plastic_bottles.htm).

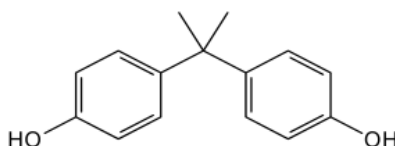
Plasty	Číslo + zkratka	Druh plasty	Grafický znak				
	1 PET	polyethylen-tereftalát					
	2 PE-HD	(HDPE) polyethylen vysoké hustoty	PET	PET	1	HDPE	2
	3 PVC	polyvinylchlorid					
	4 PE-LD	(LDPE) polyethylen nízké hustoty	PE-HD	LDPE	4	PP	5
	5 PP	polypropylen					
	6 PS	polystyren	LDPE	PS	6	PE-HD	PVC
	7 - 19	ostatní druhy plastů					

Obr 1: Přehled nejčastěji používaných plastů a jejich recyklační symboly

Zdroj: <http://www.hustopece-city.cz/zivotni-prostredi/odpady/co-byste-jeste-meli-vedet/>

4. BISFENOL A

Bisfenol A (BPA) je organická sloučenina, která byla objevena roku 1891 ruským chemikem Alexandrem Pavlovichem Dianinem. První, kdo ji dokázal syntetizovat, byl Thomas Zincke z Malburgské univerzity v Německu. Podkladem pro jeho práci byly již dříve napsané disertační práce na toto téma, ty však nebyly publikovány. Výsledky Zincke zveřejnil roku 1905. Znovuobjeven byl bisfenol A až ve třicátých letech dvacátého století, kdy si britský chemik Charles Edward Dodds všiml jeho podobnosti s estrogenem. Uvažovalo se o jeho využití v hormonální terapii, ale protože jeho účinnost byla slabá, byl bisfenol A později nahrazen účinnějším diethylstilbestrolem (<http://www.bisphenol-a.org/about/bpa-info/bpa-synthesis.html>, Vogel 2009).



Obr. 2: Molekulární struktura bisfenolu A.

Převzato z: Jordáková et al. (2003)

Roku 1953 vyvinuli nezávisle na sobě vědci Dr. Hermann Schnell z německé firmy Bayer a Dr. Dan Fox z firmy General Electric v USA výrobní proces nového plastického materiálu, jehož výchozí surovinou byl právě bisfenol A. Materiál byl pojmenován jako polykarbonát, známý též jako Lexan – obchodní známka firmy General Electric nebo Makrolon či Makroclear. Průmyslová výroba začala nejprve ve Spojených státech roku 1957 a o rok později i v Evropě. Přibližně ve stejnou dobu byly připraveny i první pryskyřice s obsahem bisfenolu A (<http://www.bisphenol-a.org/about/bpa-info/bpa-synthesis.html>).

Bisfenol A se připravuje reakcí dvou molekul fenolu s jednou molekulou acetonu (proto A na konci) za přítomnosti silné kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, sírová nebo fosforečná. Vzniklý produkt je nutno ještě predestilovat, protože čistota pro použití na výrobu polykarbonátů musí být vyšší než 99,8 % (Fišera a Králík 1997)

Polykarbonáty jsou polymerní sloučeniny, které dostaly jméno podle opakující se karbonové skupiny. Ta vzniká reakcí bisfenolu A s fosgenem. Proces je ale složitější. Nejprve musí dojít k deprotonizaci bisfenolu A v reakci s hydroxidem sodným. Vzniklá sloučenina se nechá reagovat s fosgenem a následnou polymerizací vzniká

polykarbonát. Lze jej připravit i jiným, šetrnějším postupem, kterým je transesterifikační reakce s difenylkarbonátem (<http://www.pslc.ws/macrog/level4.htm>).

Mezi bisfenolem a fosgenem vzniká esterová vazba. Tento typ vazeb je náchylný k hydrolytickým reakcím, zvláště probíhají-li za vyšší teploty a při kyseljším pH. Ve výsledku dochází k postupnému uvolňování bisfenolu A z plastu do obsahu nádoby (Taylor et al. 2011).

V roce 2003 se světová produkce BPA pohybovala kolem tří miliónů tun ročně a jeho výroba se ročně zvedne o 6 – 7 %. Většina, téměř dvě třetiny vyrobeného množství, je použita na výrobu polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic, velká část se také využije při výrobě zpomalovačů hoření, lepidel, antioxidantů, nebo brzdových kapalin. BPA se také používá jako součást zubních výplní. Člověk je této látce vystaven denně a téměř neustále. Dalo by se říci, že BPA potkáme na každém kroku. Nachází se ve vodě, v půdě, v prachu a většina z nás ho má v krvi (Senjen a Azoulay 2008).

Tab. 1: Výskyt bisfenolu A ve vodě a v půdě

Umístění	Průměr nebo rozsah průměru (ppb)	Rozsah (ppb)
Povrchové vody	0,012 - 0,14	0,0009 - 12
Podzemní vody	0,0041 - 1,9	0,006 - 2,55
Pitná voda	0,005 - < 0,1	<0,1 - 0,42
Odpadní vody	<0,1	0,0036 - 50
Půda	6 - 7	4 - 14

Zdroj:

http://www.epa.gov/opptintr/existingchemicals/pubs/actionplans/bpa_action_plan.pdf

4.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Bisfenol A je za pokojové teploty v pevném stavu. Vypadá jako bílé až světle hnědé vločky, granule nebo jemný prach. Svým zápachem připomíná známý nemocniční pach dezinfekčních prostředků. Je slabě hydroskopický. Rozdělovací koeficient voda-oktanol se pohybuje v rozmezí 2,2 a 3,8 (<http://www.bisphenol-a.org/pdf/BPAsafe.pdf>).

Bisfenol A je součástí polykarbonátových plastů, kterým dodává tyto vlastnosti: nerozbitnost, pevnost, tepelnou odolnost od 40°C do 145°C a odolnost vůči působení

kyselin. PC plasty jsou průsvitné, bez kalu. BPA se nachází také ve všech netříštivých plastech, které se mimo jiné používají i k výrobě lahví na vodu, dětských kojeneckých lahví, plastových nádob na jídlo a potravinářských fólií. Směsí epoxidových pryskyřic s BPA se potahuje vnitřní vrstva plechovek (<http://www.bisphenol-a.org/human/polyplastics.html>, Senjen a Azoulay 2008).

Tab. 2: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti bisfenolu A

Systematický název	2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan
Sumární vzorec	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Molekulová hmotnost	228 g/mol
Bod varu	220 °C
Bod tání	154 – 155 °C
Hustota	1,2 g/cm ³
Rozpustnost	120 – 300 mg/l

Zdroj: <http://www.bisphenol-a.org/pdf/BPAsafe.pdf>

Co se nebezpečnosti bisfenolu A týká, platí pro něj tyto věty:

- R 37 Dráždí dýchací orgány.
- R 41 Nebezpečí vážného poškození očí.
- R 43 Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.
- R 62 Možné nebezpečí poškození reprodukční schopnosti.

Pro bezpečné zacházení s chemikálií platí tato doporučení:

- S 26 Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.
- S 39 Používejte osobní ochranné prostředky pro oči a obličej.
- S 45 V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc.
- S 46 Při požití okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc a ukažte tento obal nebo označení.
- S 36/37 Používejte vhodný ochranný oděv a ochranné rukavice.
- S 36/37/39 Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít (http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5854419.htm).

4.2. Toxicita

Vysoké dávky bisfenolu A jsou akutně toxické pro organizmus. Při podání střední letální dávky (LD₅₀) laboratorním potkanům i.v. cestou došlo k okamžité zástavě respirace, hypotenzi a bradykardii. Zvířata zemřela do osmi minut. Příčinou tak rychlého úhynu potkanů bylo s největší pravděpodobností utlumení respiračního a vasomotorického centra v prodloužené míše (Pant a Deshpande 2012).

Přestože množství, které se uvolňuje z plastových výrobků, je nepatrné, může dlouhodobý příjem nízkých dávek BPA vést ke změnám v organizmu. Byl vypracován nespočet studií, které se zabývaly, škodlivým vlivem nízkých dávek BPA na zvířecí organizmus, a mnohé ho potvrdily. Studie se zaměřují na ovlivnění vývoje reprodukčních orgánů, ovlivnění plodnosti, působení na štítnou žlázu, pankreas, imunitní systém a vývoj mozku. Byly také vypracovány studie, které hledaly souvislosti mezi expozicí BPA a kardiovaskulárními onemocněními a obezitou.

Tab. 3: Předpokládaná bezpečná dávka BPA porovnaná s toxicitou nízkých dávek podávaných hlodavcům

Účinky	Dávka (mg/kg/den)
Uvažovaná bezpečná dávka pro zvířata	5
Uvažovaná bezpečná dávka pro člověka	0,05
Účinky na vagínu	0,1
Zvětšení prostaty	0,05
Dlouhodobé změny chování u adolescentů a dospělých	0,04
Abnormální vývin prostaty	0,025
Abnormální vývin prsních žláz	0,025
Snížená produkce spermií	0,2
Předčasná puberta dívek	0,0024
Změny v mužských pohlavních žlázách	0,002
Zvýšená hmotnost prostaty u dospělých	0,002
Snížená hmotnost varlat	0,002

Převzato z: Pokoj (2010).

4.3. Tolerovaný denní příjem

Přes všechny nové studie, které prokazují škodlivé působení dávek nižších, než jsou tolerované, nedošlo ke změně hodnoty tolerované denní dávky, která tak i nadále činí 0,05 mg/kg/den. S tímto prohlášením přišel Evropský úřad pro kontrolu potravin v září roku 2010. Hodnota tak zůstává od roku 2006 nezměněna (<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/afc070129.htm>).

4.4. Limity bisfenolu A v lahvích

V současné době není stanoven žádný limit pro množství BPA, který se nachází v konečném plastovém výrobku, přestože jeho schopnost migrovat z těchto materiálů byla potvrzena. Stanovuje se pouze specifický migrační limit (SML), což je nejvyšší povolené množství bisfenolu A v potravine. Tento limit by měl zajistit, že daný materiál určený pro styk s potravinami nepředstavuje zdravotní riziko. Evropská unie v roce 2002 stanovila SML na 3 mg na kilogram jídla. O dva roky později byla hladina BPA snížena na 0,6 mg/kg. V USA v současné době limity SML pro bisfenol A stanoveny nejsou (Lawley et al. 2008).

Používání bisfenolu A v kojeneckých lahvích je omezeno Směrnicí komise 2011/8/EU. Ta nařizuje od 1. března 2011 zákaz výroby kojeneckých lahví s PC a od 1. června 2011 zákaz jejich uvádění na trh a dovoz. Do národní legislativy byla tato směrnice zakotvena Vyhláškou č. 111/2011, kterou se mění vyhláška č. 38/2001 Sb., o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy, ve znění pozdějších předpisů. V účinnost vstoupila 1. 5. 2011, což je o více než dva měsíce později než nařizovala EU (Směrnice Komise 2011/8/EU, Vyhláška o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy).

4.5. Endokrinní disruptory

BPA patří mezi endokrinní disruptory (ECD). Chová se tedy jako estrogenní agonista a současně jako androgenní antagonist. Podle National Institutes of Health (NIH) jsou endokrinní disruptory definovány jako látky, které zasahují do endokrinního systému a které způsobují nežádoucí vývojové, reprodukční, neurologické a imunologické vady jak u zvířat, tak u člověka. Endokrinní disrupce působí funkční změny, které dále mohou vést k poškození organismu (<http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/>).

Toxikologie pracuje s předpokladem, že u podané látky se projevuje účinek jen tehdy, pokud koncentrace přesáhne určitou mez. Tento práh, pod kterým nejsou pozorovány žádné účinky, se nazývá hodnota bez pozorovatelného negativního účinku (NOAEL - No Observable Adverse Effect Level). S množstvím látek, které jsou podány pod touto koncentrací, se organismus dokáže vypořádat sám pomocí svého obranného mechanismu. Je-li podán množství nad touto koncentrací, stoupá odpověď organismu a projevuje se účinek látky. U endokrinních disruptorů tento předpoklad neplatí. Ty narušují hormonální signální systém a k tomu dochází i při podání dávky pod hodnotou NOAEL (Senjen a Azoulay 2008).

Velmi rozporuplné jsou výsledky při hodnocení vztahů dávky a účinku. Endokrinní disruptory často působí mimikrujícím nebo antagonistickým účinkem na hormony, které se vyskytují fyziologicky. Neznalost je také v oblasti účinku při nízkých expozicích na lidský organismus. Kritický význam je v načasování doby expozice v průběhu života, kdy vystavení stejné dávce v různých etapách života může vyvolat různě se projevující onemocnění. Zatímco vystavení ECD v dospělosti může být kompenzována homeostatickými mechanismy, expozice při nitroděložním vývoji nebo v dětství může vést k trvalým změnám funkce, či ke změně citlivosti na signály. Účinky endokrinních disruptorů se mohou projevit v jiném endokrinním systému, než se předpokládá (Hrubá 2009).

Vliv BPA na lidský organismus je velmi těžké odhadnout, protože většina populace je vystavena jen velmi nízkým dávkám. Studie, které se problematikou zabývají, nejsou prováděny stejnými metodami a zaměřují se na různá období života. Přesto jisté souvislosti mezi vystavením ECD a projevy existují. Sleduje se především vliv na reprodukční schopnosti, nervové a psychické poruchy, narušení imunitních funkcí a nádorové bujení. Popsáno bylo především snížení kvality lidského spermatu,

zvýšená incidence vývojových anomálií mužského reprodukčního systému, dřívější nástup puberty, časté spontánní potraty vlivem chromozomálních abnormalit nebo abnormalit dělohy, endometrióza, poruchy vývoje nervové soustavy, neuroendokrinnologických funkcí, poruchy chování, narušení funkce štítné žlázy, poruchy imunity, nádorová onemocnění (Hrubá 2009).

4.6. Mechanismus účinku

Způsobů, jakým bisfenol A působí na organismus, je mnoho a některé z nich nejsou ještě přesně popsány. BPA je schopen ovlivňovat poměrně široké spektrum receptorů. Dále dokáže ovlivnit činnost aromatázy a poškodit DNA.

4.6.1. Působení přes receptory

Jedním z mechanismů, jak může BPA působit a ovlivňovat buňky, je přes jejich estrogenní receptory (ER). Tyto receptory patří do rodiny steroidních receptorů. ER je ligandem aktivovaný jaderný transkripční protein. Hlavním přirozeným ligandem je estradiol a díky podobnosti s tímto hormonem může být receptor aktivován i bisfenolem A (Hulinková 2009). Přitom afinita bisfenolu A je asi 10 000krát slabší než je afinita estradiolu k těmto receptorům (EC_{50} bisfenolu A je $2-7 \times 10^{-7}$ M, zatímco EC_{50} estradiolu je $1-6 \times 10^{-13}$ M). Bisfenol se váže k oběma isoformám ER – α i β . Vazba BPA k ER β je asi 10 krát silnější než k ER α (Schug et al. 2012, Thaddeus et al. 2012).

Estrogenní receptory mají genomovou nebo negenomovou funkci. Genomová funkce spočívá v aktivaci transkripce úseku DNA. Nejprve dojde k navázání ligandu na receptor, který se nachází buď v cytoplasmě, nebo v jádře. V cytoplasmě se receptory vyskytují v inaktivní formě v komplexu se stresovými proteiny (HSP). Po navázání ligandu na receptor dochází k migraci komplexu z cytoplazmy do jádra, změně konformace receptoru a dimerizaci. Vzniklý komplex se naváže na estrogen responzivní element (ERE). ERE jsou zesilovací místa, která se nachází v promotoru, tedy v regulačních oblastech DNA. Po navázání komplexu a dalších konjugačních faktorů na promotor dojde k transkripci a syntéze proteinů, které jsou potřebné pro projevení hormonálního děje (Bílková 2011).

BPA má i nengenomové účinky. Nedochází při nich k nastartování transkripce, ale ovlivňují jiné struktury buňky, mohou např. ovlivnit propustnost některých iontových kanálů.

Další estrogenní receptory jsou vázány v membráně a bývají označovány jako ncmER (non classical membrane ER). K těmto receptorům patří membránový estrogenní receptor (mER) a také transmembránový receptor GPR30 (Thomas and Dong 2006). K jejich aktivaci stačí pikomolární až nanomolární koncentrace BPA, které by nestačily k aktivaci jaderných receptorů (Watson et al. 2007). Po aktivaci těchto receptorů nedochází k aktivaci genů.

GPR30 je receptor spřažený s G proteinovou aktivitou (G protein-coupled receptor). GPR30 je strukturně jiný, ale patří mezi ER, proto je také zkracován jako GPER. Funkce tohoto receptoru byla důkladně prozkoumána při studiu β buněk pankreatu. Po aktivaci tohoto receptoru dochází ke zvýšení hladiny cGMP, který aktivuje protein kinázu G a ta způsobí uzavření kanálků pro draslík. Následná depolarizace membrány vede k otevření vápenatých kanálků a influxu Ca^{2+} , které způsobí exocytózu insulínu (Ropero et al. 2008).

ERR (estrogene related receptor) patří mezi sirotčí nukleární receptory. Rozlišují se tři základní typy ERR – α , β , γ . BPA se váže na $ERR\gamma$ ($EC_{50} = 5.5 \times 10^{-9}$ M). Přítomnost tohoto receptoru byla nalezena v mozku, kosterním svalstvu, srdci, ledvinách a v retině. Nachází se také v placentě a v plicích plodu. Vzniklý komplex se váže na ERE a aktivuje tak genovou transkripci (Slíva 2010, Thaddeus et al. 2012).

BPA se také může vázat na androgenní receptory (AR), na kterých působí jako antagonist. Potlačuje transkripční aktivitu vyvolanou dihydrotestosteronem. (Xu et al. 2005) Navíc expozice bisfenolu A způsobuje změny v umístění AR, které jsou poté roztroušeny jak v jádře, tak i v cytoplasmě (Lee et al. 2003). BPA tak působí nejen jako androgenní antagonist, ale také ovlivňuje aktivaci a fungování AR.

BPA je schopný rovněž se vázat na thyreoidální receptory, kde působí jako antagonist a zabraňuje navázání trijodthyroninu. BPA se také váže na arylhydrokarbonátový receptor (AhR), ale jeho účinek po aktivaci bisfenolem nebyl zatím popsán (Vandenberg et al. 2009).

4.6.2. Ovlivnění činnosti aromatázy

Dalším mechanismem působení BPA je ovlivnění činnosti aromatázy, která je hlavním enzymem při tvorbě steroidních hormonů a která katalyzuje přeměnu androgenů na estrogeny.

Příkladem, kdy BPA zvyšuje činnost aromatázy, je studie od Kim et al. (2010), kteří se zabývali vlivem BPA na testikulární Leydigovy R2C nádorové buňky. Zjistili, že BPA stimuluje činnost aromatázy a expresi jejího genu. Toto je navíc umocněno zvýšenou syntézou COX-2, jejíž transkripci BPA stimuluje. COX-2 se nevyskytuje ve zdravých buňkách, ale pouze v těch, které jsou rakovinotvorné. Zvýšená exprese tohoto enzymu je v nádorových buňkách tlustého střeva, žaludku, plic, jater, pankreatu a varlat. Zvyšuje-li se množství COX-2, zvyšuje se i množství aromatázy (Kim et al. 2010).

4.6.3. Poškození genetické informace

BPA také může způsobit epigenetické změny, jakým je změna methylace DNA. Přesný mechanismus methylace DNA není doposud přesně znám. Methylovány bývají nejčastěji cytosinguaninové dinukleotidy (CpG) v pozici C5. CpG dinukleotidy se nacházejí v blízkosti promotoru a velikost jejich methylace může regulovat transkripci genu. Je-li methylace na CpG zvýšena, dochází k dědičnému utlumení transkripce tohoto genu. Snížení methylace má za následek zvýšení transkripce genu (Wolstenholme et al. 2011).

Jednou ze studií, která se zabývala vlivem BPA na methylaci DNA je studie Dolinoy et al. (2007). Ve studii byly požitý aguti myši. Při podávání BPA došlo v průběhu několika generací ke změně barvy srsti. Příčinou změny fenotypu byl pokles methylace DNA na devíti sledovaných CpG úsecích (Dolinoy et al. 2007).

4.7. Farmakokinetika

4.7.1. Absorpce

BPA podaný laboratorním potkanům perorálně se vstřebává ze střev. Nejefektivněji probíhá transport z mukózní do serózní části v distálních částech střeva. Volný BPA je nejvíce vstřebáván v tlustém střevě, kde se absorbuje až 48,6 % BPA z dávky 2 μ mol, zatímco v proximálním jejunu jen 37,5 %. Ovšem už v proximální části střeva dochází k rozsáhlejší glukuronidaci volného BPA. Proximální jejunum má tedy ochrannou funkci, kdy výrazně snižuje možnost transportu volného BPA do krevního oběhu (Inoue et al 2003).

Glukuronidovaný BPA se vstřebává také. Nejvíce přechází na serózní stranu v tlustém střevě (478,4 nmol), naopak na mukózní stranu přejde v této části střeva jen 67,2 nmol. Glukuronovaný BPA je vylučován především v tenkém střevě, kde je jeho absorpce minimální (Inoue et al. 2003).

4.7.2. Distribuce

Poté, co se volný BPA dostane ze střev do krevního oběhu, je vystaven first-pass metabolismu v játrech, kde je většina BPA konjugována. V této formě se pak dostává do tkání, kde může být konjugát hydrolyzován.

BPA je ve velké míře vázán na bílkoviny krevní plasmy, nevázáno je pouze 5 %. Distribuce BPA je také ovlivněna rozdělovacím koeficientem mezi krví a tkáněmi. Tento koeficient se pohybuje v průměru kolem 1,41 a platí pro většinu orgánů, jako jsou játra, placenta, ledviny, svaly, mozek. Vyšší afinita je u nadledvin - 1,82, nejvyšší pak v tukové tkáni, kde rozdělovací koeficient dosahuje hodnoty 3. Je tam tedy 3x větší kumulace BPA než v ostatních tkáních (Csanády et al. 2002).

Tab. 4: Rozdělovací koeficient BPA mezi tkání a krví u člověka při 37°C

Tkáň	Průměr	Směrodatná odchylka	Rozsah	n
Mozek	1,06	0,09	0,96-1,12	3
Ledviny	1,35	0,17	1,21-1,54	3
Játra	1,46	0,38	1,16-1,89	3
Tuk	3,31	0,17	3,15-3,49	3
Svaly	1,35	0,31	1,02-1,71	4
Prsní žlázy	0,90	-	-	1
Placenta	1,43	0,34	1,05-1,71	3
Nadledvinky	1,82	0,55	1,28-2,38	3

Zdroj: Csanády et al. (2002)

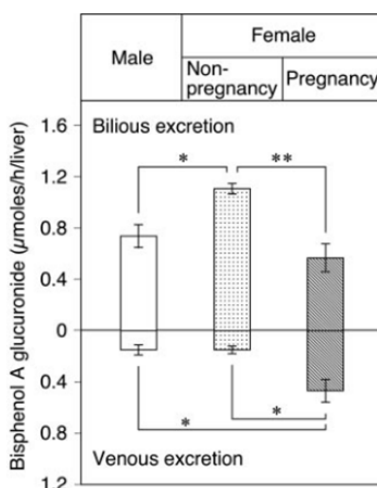
Distribuce přes placentární bariéru

Placenta je považována za bariéru, která chrání plod před vystavením a působením xenobiotik. Přesto byl v plodu a plodové vodě při pokusech na potkanech detekován BPA. Do placenty se BPA dostává ve své glukuronidované podobě, která je více lipofilní a tudíž může přejít přes placentární bariéru. Tomu napomáhají transportéry, jako jsou organic anion-transporting polypeptide 4a1 (Oatp4a1) a multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1). Tyto transportéry jsou využívány pro přenos konjugovaných steroidních hormonů, jako je 17 β -estradiol-glukuronid a dehydroepiandrosterone sulfát. Oatp4a1 je lokalizován na apikální membráně trofoblastu a je odpovědný za influx. MRP1 transportéry se nachází na basolaterální membráně a slouží pro efluxní transport. Konjugovaný BPA je následně dekonjugován v trofoblastu placenty, kde byla pozorována zvýšená exprese β -glukuronidázy. Dekonjugovaný BPA se pak do plodu dostane pasivní difúzí. Glukuronovaný BPA, který se dostal do plodu, zde může být také dekonjugován, a to zejména v játrech a srdci (Nishikawa et al. 2010).

U březích a laktujících potkanů dochází ke snížení produkce UGT2B1 v játrech. Důvodem je pokles mRNA UGT. Tento stav trvá až do termínu porodu, kdy se s blížícím se dnem porodu pomalu zvyšuje i hladina enzymu. Za normálního stavu by byl bisfenol A vcelku rychle glukuronidován a vyloučen do žluče, ale u březích potkanů je absorbován do krve, není metabolizován, překoná placentární bariéru a dostane se do plodu. Protože plod nemá ještě plně vyvinutý jaterní enzymatický systém, nedochází u něj k metabolizaci bisfenolu A, který se v játrech hromadí. Aktivita enzymů se postupně zvyšuje. Začíná se objevovat už několik dní před porodem a po dosažení 21. dne je stejná jako u dospělých. Protože do té doby nejsou plody ani narozená mláďata chráněna, může dojít k poškození reprodukčních orgánů. U narozených mláďat není rozdíl v pohlaví při rozvoji aktivity UGT, vyjma třetího dne, kdy hladina UGT2B1 je vyšší u samic (Matsumoto et al. 2002).

Porovnání glukuronidace u samců, samic a březích samic

Při pokusech byla použita játra linie CD. Měřila se účinnost glukuronidace při podání 10 a 50 μM BPA. U obou koncentrací byla větší koncentrace konjugátu u samic než u samců. Při 10 μM bylo větší uvolňování BPA glu do žluče, ovšem při 50 μM byla větší detekce v krevním oběhu.



Obr. 4: Popis exkrece glukuronovaného BPA do žluče (horní část obrázku) a žil (dolní část) v průběhu jedné hodiny

Zdroj: Inoue et al. (2005)

Při perfúzi byl použit 10 μM roztok. Větší koncentrace BPA glu byla nalezena v játrech samic (84 %), než u samců (59 %). Samice rovněž vyloučily po jedné hodině 1,4x více konjugátu do žluče než opačné pohlaví. U březích samic bylo při testování 10

μM BPA konjugováno jen 69 %, z toho bylo vyloučeno 54,5 % do žluče a zbytek do oběhu. Za hodinu březí samice vyloučily o polovinu méně BPA-glukuronidu než ne březí (Inoue et al. 2005).

Minoritní cestou metabolizace BPA je sulfatace. Je zprostředkována sulfotransferázou, a to hlavně isoformou SULT1A1, která přednostně konjuguje fenoly. Schopnost sulfatace je větší u žen než u mužů. Důkaz přinesla studie od Kim et al. (2003), který sledoval poměr volného BPA, glukuronovaného a sulfatovaného BPA ve vzorcích moče třiceti korejských účastníků výzkumu. Poměr volného BPA k celkovému byl stejný u mužů i žen. BPA-glu byl hlavním metabolitem u mužů, zatímco u žen bylo množství glukuronovaného a sulfatovaného BPA skoro stejné (Kim et al. 2003).

Výsledky studie Pottenger et al. (2000), který sledoval směr metabolisace BPA, jsou uvedeny v Tab. 5. V moči Fischer 344 (F-344) potkanů sledoval množství volného BPA, glukuronidu a sulfátu po orálním podání 100 mg BPA/kg.

Tab. 5: Distribuce hlavních metabolitů v moči

	Samci	Samice
BPA	9,7 %	11,6 %
BPA-glukuronid	57,0 %	70,0 %
BPA-sulfát	1,7 %	3,6 %

Zdroj: Pottenger et al. (2000)

4.7.4. Exkrece a transportní systém

Jak už bylo zmíněno, hlavními vylučovacími cestami BPA a jeho metabolitů je cesta hepatální a renální. BPA je ve formě glukuronidu transportován do žluče přes multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) transportéry. Tyto transportéry se nachází kromě jater také v proximálním kanálku v ledvinách, epitelu střev, žlučníku, bronších a placentě. Transportéry se specializují převážně na exkreci glukuronidovaných molekul (<http://www.solvobiotech.com/transporters/mrp2>).

Při deficitu MRP2 přebírá jeho pransportní funkci MRP3. Takovým případem je doba březosti potkanů, kdy je utlumena tvorba mRNA. MRP3 však nejsou tak výkonnými transportéry. Proto dochází k jejich přesycení, a tím se prodlužuje i doba

exkrece. MRP3 transportéry navíc preferují vylučování glukuronovaného BPA do krevního oběhu, a ne do žluče. Na rozdíl od MRP2 a MRP3 se množství transportérů MRP1 v těhotenství nemění (Inoue et al 2005, Cao et al. 2002).

Vylučování BPA-glukuronidu do střeva se odehrává nejvíce v proximální části jejunu. Zde se také nacházejí transportéry MRP2. Exkrece probíhala také v ileu a tlustém střevě, ale už v menším množství. V těchto částech střeva se nachází MRP3 (Inoue et al. 2003).

Snyder et al. (2000) se zabýval sledováním metabolismu a vylučováním BPA po jeho orálním podání dvěma kmenům pokusných potkanů – Fischer 344 (F-344) a Sprague – Dawley (CD). Bisfenol A byl označen radioaktivním izotopem C^{14} a detekován na HPLC. Podáno bylo 100 mg/kg. Z tohoto množství bylo 93 % získáno zpět. Hlavním metabolitem v moči byl BPA glukuronid. Volný BPA byl přítomen jen ve velmi nízkém množství. Volný BPA buď unikl metabolizaci a byl zachycen až v ledvinách, nebo byla jeho glukurovaná forma hydrolyzována v moči. Ve stolici byl hlavní složkou BPA, který se zřejmě nevstřebal v žaludku a pokračoval dál, nebo byl jako glukuronid transportován hepatobiliární cestou do střev, kde byl hydrolyzován zpět na BPA (Snyder et al. 2000).

Tab. 6 uvádí procentuální zastoupení značeného uhlíku BPA v moči, trusu a v tělech potkanů. Nejvíce C^{14} - BPA bylo vyloučeno trusem a močí, celkem přes 91 %. Při srovnání obou kmenů došlo k rychlejšímu vyloučení u F-344, kteří vyloučili během 6 dnů 42 % v moči, což je dvakrát více než CD potkani za stejnou dobu. U trusu je tomu naopak, touto cestou vylučoval více CD kmen, a to až 70 % z podané dávky. F-344 vyloučili trusem jen 50 % (Snyder et al. 2000).

Tab. 6: Dispozice radioaktivního izotopu ^{14}C v moči, trusu a v tělech CD a F-344 potkanů po 144 hodinách od podání

Vzorky	Procenta z podané dávky	
	CD	F-344
Moč	21 ± 1,8	42 ± 4,1
Trus	70 ± 9,1	50 ± 4,9
Tělo	1,4 ± 1,2	1,1 ± 0,6
Celkově	93 ± 12	93 ± 9,7

Zdroj: Snyder et al. (2000)

Pottenger et al. (2000) se zabývali podobnou problematikou. Při podání 100 mg/kg vylučovaly F-344 potkani močí jen 14 % a 27 % BPA u samců a samic, vylučování trusem bylo vyšší (Pottenger et al. 2000).

4.7.5. Bisfenol A v mateřském mléce

Snyder et al. (2000) se dále zabýval distribucí a exkrecí BPA v těle matky během období laktace. Po orálním podání 100 mg/kg C^{14} BPA se sledoval přenos radioaktivity z matky na mláďata v intervalu 1 h, 8 h a 26 h. U matky byla většina z dávky (83, 75 a 26 %) nalezena ve střevech a střevním obsahu. Druhá nejvyšší koncentrace byla v játrech po osmi hodinách. Při každém měření byla radioaktivita nejvyšší v plazmě, pak v krvi a na konec v mléku. Nejvyšší koncentrace byly na začátku testu. V mléku se postupně snižovaly - 1,0 μ g/ml, 0,6 μ g/ml a 0,3 μ g/ml. Hlavním metabolitem v mléku byl BPA-glukuronid.

Radioaktivita se postupně hromadila v těle mláďat a měřila se po 2h (44 μ g/kg), 4 h (63 μ g/kg), 6 h (54 μ g/kg) a 24 h (78 μ g/kg). Zřejmě vlivem β -glukuronidázy v mléku a ve střevech došlo k rozštěpení glukuronidové vazby, a proto se v mláďatech hromadil BPA. Naměřená radioaktivita v těle mrtvých mláďat byla po 24 h 78 μ g/kg (Snyder et al. 2000).

4.7.6. Srovnání účinku BPA a BPA-glukuronidu na estrogenní receptory

Podle Snyder et al. (2000) je BPA agonistou na obou estrogenních receptorech ER α a ER β . Jeho schopnost vázat se na tyto receptory zkoušel na buňkách lidských jater HepG2. EC₅₀ u ER α je pro aktivaci luciferázy bisfenolem A $6,4 \times 10^{-7}$ a u ER β $8,9 \times 10^{-7}$ M. Pro estradiol jsou tyto hodnoty na $1,9 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-8}$ M. BPA-glukuronid měl při nejvyšší použité koncentraci 3×10^{-5} M jen minimální vliv na ER receptory. BPA-glukuronid není tedy schopný aktivovat HepaG2 buňky. V těchto jaterních buňkách dochází k metabolizaci BPA na BPA-glukuronid jen v malém množství. 95 % radioaktivně značeného uhlíku zůstalo v podobě volného BPA, ale jen 0,3 % ve formě konjugátu. HepG2 nejsou schopny zpětně hydrolyzovat BPA-glukuronid na BPA (Snyder et al. 2000).

4.8. Analytické metody pro stanovení BPA v biologickém materiálu

Nejpoužívanější analytickou metodou pro stanovení BPA je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční nebo spektrometrickou detekcí. Vhodnou metodou je také plynová chromatografie se spektrometrickou detekcí. Podstatně méně používanou metodou je imunologické stanovení metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Bisfenol A může být některými metodami analyzován přímo, bez předchozí separace z biologického materiálu. Takovou metodou je kapalinová chromatografie (LC). Jako detekční metoda se používá UV detekce, detekce fluorescenční metodou, elektrochemická detekce, hmotnostní spektrometrie (MS) a tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS).

Detekce pomocí UV je málo používaná. Důvodem je nízká hodnota absorpance molekuly bisfenolu A, proto je i nízká citlivost UV detektoru. Kvantitativní limit pro tento detektor je při vlnové délce 228 nm v rozsahu 5 – 150 ng/ml.

Fluorescenční detekce je jednou z nejpoužívanějších metod. Bisfenol A obsahuje dva benzenové kruhy s konjugovaným systémem π elektronů – je tedy silným fluoroforem. V některých případech je však třeba derivatizace 4-(4,5difenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloridem nebo p-nitrobenzyl chloridem. LOQ je až 10 ng/ml.

LC-MS a LC-MS/MS využívá značených izotopů BPA-d16, BPA-d14 a [¹³C]BPA. Tandemová hmotnostní spektrometrie poskytuje mnohem více informací o složení analyzované látky a umožňuje přesnější identifikaci jednotlivých složek. Jejich výhodou je, že jak volný, tak konjugovaný bisfenol A mohou být separovány LC a detekovány současně bez nutnosti enzymatického štěpení glukuronidu. Citlivost obou metod je podobná.

Další používanou analytickou metodou je plynová chromatografie se spektrometrickou detekcí. V porovnání s LC-MS detekcí je její výhodou vyšší citlivost a nižší detekční limit. Nevýhodou je nutnost derivatizace pro potřebu kvantitativního stanovení.

Nejméně používanou metodou je imunoanalytická metoda ELISA. Použití ELISA metody totiž není možné bez předchozí úpravy biologického vzorku. Nejčastějšími a také nejúčinnějšími metodami separace bisfenolu A z biologického materiálu jsou extrakce rozpouštědlem a extrakce na pevné fázi. Nevýhodou této metody je,

že nerozlišuje mezi volným a konjugovaným bisfenolem A a také má poměrně vysokou zkříženou reaktivitu se strukturami podobnými BPA, jako je bisfenol B nebo bisfenol E (http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/1_chemistry_analytical_methods.pdf).

4.9. Kojenecké lahve

V posledních letech se věnuje velká pozornost obsahu bisfenolu A v kojeneckých lahvích. Tyto lahve jsou během svého každodenního používání vystaveny extrémním vlivům, jako je mytí v myčce nádobí, vypařování, sterilizace v mikrovlnné troubě nebo chemická sterilizace. Při těchto procedurách, zvláště pokud se často opakují, je narušen povrch lahve, a BPA se tak může lépe uvolňovat do obsahu nádoby.

Dítě během svého prvního roku života zkonsumuje přibližně 150 ml potravy na kilogram tělesné hmotnosti denně a pokud je krmeno především z PC lahví, může to znamenat možné riziko pro jeho zdraví.

Studie se nejčastěji zaměřují na stanovení zbytkového množství BPA obsaženého v nových PC lahvích a pak na jeho uvolňování ze stěn nádoby během používání.

4.9.1. Detekce bisfenolu A v kojeneckých lahvích

Vzorem pro stanovení zbytkového množství BPA v nových, dosud nepoužitých lahvích, je studie Biles et al. 1997. Tento postup byl i vodítkem pro Wong et al. (2005) a Moutfort et al. (1997).

Postup byl následující: Odeberal se vzorek PC lahve o hmotnosti 0,5 – 1 g. Vzorek se nechal rozpustit v 10 ml dichlormethanu (šlo použít i chloroform). Rozpouštění trvalo přibližně 30 minut, po tu dobu bylo možno protřepávat. Po rozpouštění se polymer precipitoval použitím 25 ml methanolu nebo 10 ml propan-2-olu. Precipitát se nechal usadit, následně se odebral a zfiltraval přes nylonovou filtrační membránu. Filtrát se zředil acetonitrilem nebo se přidal hexan – součást mobilní fáze. Detekce probíhala na HPLC-FL nebo na GC-MS. Totožnost BPA se ověřila srovnáním retenčních časů se standardem a množství BPA, čili kvantita se stanovila za pomoci kalibrační křivky standardů (Wong et al. 2005, Moutfort et al. 1997, Yamamoto and Yasuhara 1999). Totožnost BPA byla potvrzena na GC-MS.

Wong et al. (2005) stanovili detekční limit na 3 mg/kg. Tento limit přesáhlo 19 vzorků lahví z 28 s množstvím BPA od 4,01- 141 mg/kg. Průměrné množství je $28,1 \pm 31,4$ mg/kg. Tak velká odchylka vznikla z důvodu velkých rozdílů mezi

jednotlivými koncentracemi BPA v lahvích. Příčinou tak vysokého množství zbytkového BPA je zřejmě chyba v polymerizačním procesu, který neproběhl úplně (Wong et al. 2005).

4.9.2. Uvolňování bisfenolu A při používání lahví

Uvolňování BPA se sleduje v závislosti na době expozice, obsahu, do kterého se složky uvolňují (složení, pH,...) a teplotě. Vodítkem pro navození správných podmínek testování bývají Pokyny pro průmysl, které doporučují:

- 10% ethanol, jedná-li se o stravu vodnatou nebo kyselou,
- 10% nebo 50% ethanol, jedná-li se o stravu s nízkým, nebo vysokým obsahem alkoholu,
- potravinové oleje, jako je např. kukuřičný olej, miglyol 812 nebo HB307 jedná-li se o stravu bohatou na tuky. (US FDA 2007)

Pro simulaci potravy v lahvích se používá nejčastěji voda nebo ethanol (až 50% vodný roztok), který napodobuje složení mateřského mléka, popřípadě 3% roztok kyseliny octové pro napodobení ovocných džusů (Aschberger et al. 2010). Přitom do ethanolu se vylučuje větší množství BPA než do vody. Důkaz tohoto tvrzení nám poskytuje studie Kubwabo et al. (2009), která se zaměřila mimo jiné i na porovnání uvolňování BPA do vody a 50% ethanolu při konstantní teplotě 40°C. Vzorky jsou odebírány po 8 h, 24 h a 240 h. Přestože nejlepším simulantem mléka by byl olej, zde použit nebyl z důvodu problémové analýzy BPA v tomto základě (Kubwabo et al. 2009).

Tab. 8: Výsledky měření koncentrací residuálního bisfenolu A uvolněného z dětských lahví do vody nebo 50% ethanolu

Simulant jídla	Koncentrace BPA ($\mu\text{g/l}$) při 40 °C za:		
	8 h	24 h	240 h
Voda	0,11	0,12	1,88
50% ethanol	0,17	1,52	2,39

Zdroj: Kubwabo et al. (2009)

Kukuřičný olej byl použit ve studii Wong et al. (2005). Zde se sledovala migrace BPA v 10% ethanolu při 70°C a v kukuřičném oleji při 100°C. Vzorky se odebíraly taktéž po 8 h, 24 h a 240 h (Wong et al. 2005).

Mnohem vyšší hladina BPA byla zjištěna u opakovaně používaných lahví. Aby se navodily podmínky, které jsou blízké reálným, nechávají se lahve ve vroucí vodě, nalévá se do nich horká tekutina, myjí se v myčce nádobí nebo ručně za použití kartáčů na nádobí. Kubwabo et al. (2009) ve své studii zjistili, že největší uvolňování BPA je po druhém očištění – 0,07 µg/l. Při dalších čtyřech umytích zůstává hladina téměř konstantní 0,01 µg/l (Kubwabo et al. 2009).

Stejnou problematikou se zabýval i C. Brede et al. (2003). V této studii byly lahve čištěny 169x. Hodnoty BPA se měřily 3x, a to po prvním umytí, kde průměr BPA byl 0,23 µg/l, po 51. umytí 8,4 µg/l a pak po 169. umytí - 6,7 µg/l. Výsledky ukazují, že po nějaké době dojde vlivem extrémních testovacích podmínek k narušení povrchové struktury lahve, což umožní rychlejší depolymerizaci, a tím uvolnění BPA (Brede et al. 2003).

Ne všechny testy byly průkazné. Mountfort et al. (1997) sledovali vliv dvaceti cyklů chemické sterilizace, sterilizace parou a mytí v myčce na uvolňování BPA. Zde byla koncentrace BPA pod detekovatelnou hladinou 0,03 mg/kg (Mountfort et al. 1997).

4.9.3. Odhad denního příjmu

Odhadovaný denní příjem (EDI) je hodnota, která co nejpřesněji udává množství škodliviny přijaté potravou. Je stanovena na základě dostupných údajů z oblasti spotřeby potravin určité skupiny populace. EDI je vyjádřen v mg škodlivin na osobu.

Úřad pro potraviny a léčiva (FDA) doporučil postupy pro stanovení koncentrace BPA ve stravě:

Koncentrace BPA ve stravě = CF x M

$$= CF \times (f_{voda}M_{voda} + f_{kyselina}M_{kyselina} + f_{alkohol}M_{alkohol} + f_{tuk}M_{tuk})$$

Zdroj: US FDA 2007

CF - spotřební faktor – udává, jak velká část potravy je v kontaktu s obalovým materiálem. Představuje poměr množství stravy, která byla v kontaktu s obalem ku hmotnosti celého balíčku.

M – koncentrace BPA v obalovém materiálu, vzniká vynásobením příslušného distribučního faktoru f_x s migrační hodnotou látky pro danou potravinu M_x .

Tuto rovnici použil pro odhad denního příjmu BPA ve své studii Wong et al. (2005), ale protože není určena k výpočtu denního příjmu kojence, musel ji nejprve upravit. Protože kojenecká strava se v prvních třech měsících sestává pouze z mléka, popřípadě z kojenecké výživy, což je vlastně voda a tuk, lze rovnici upravit do podoby:

$$\text{Koncentrace uvolněného BPA ve stravě} = CF \times (f_{\text{voda}}M_{\text{voda}} + f_{\text{tuk}}M_{\text{tuk}})$$

Hodnota spotřebního faktoru byla stanovena na 1, protože všechny části tekuté stravy jsou v kontaktu s lahví. Množství potravy, které dítě přijme denně v průběhu prvních tří měsíců, je 1,52 kg. Z toho je 1,32 kg je dětská výživa a 0,2 kg voda. M_{voda} je 0,064 mg/kg a M_{tuk} 0,043 mg/kg. Pro odhadnutí denního příjmu je ještě nutné vynásobit koncentraci uvolněného BPA hmotností stravy.

$$\text{Odhadovaný denní příjem} = \text{hmotnost stravy} \times \text{koncentrace BPA ve stravě}$$

Odhadovaný denní příjem pro děti do tří měsíců byl tedy stanoven na 0,07 mg na dítě denně. Podle FDA je hodnota EDI pro 60 kilového člověka 0,0000125 mg/kg/den. Tato hodnota nepřekračuje TDI (Wong et al. 2005, US FDA 2007).

4.10. Epidemiologické studie

Studií, které se zaměřovaly na sledování hladiny BPA v organismu, je mnoho. Většinou se sledoval celkový bisfenol A, to znamená BPA volný i konjugovaný. Snad nejjednodušším způsobem zjišťování expozice je podle množství BPA v moči.

Studie, která se cíleně zabývala vztahem používání plastových lahví a koncentrací BPA v moči, probíhala na Harvardské univerzitě v USA. Účastníci studie prošli na začátku očišťovací fází, která trvala týden. Po tuto dobu nesměli pít vodu z PC lahví, ale pili z nerezových lahví, které jim byly zapůjčeny. Předposlední a poslední den očišťovací fáze studenti odevzdávali vzorky své moči a obdrželi také nové lahve, tentokrát z polykarbonátu. Z těchto lahví pili následující týden, na jehož konci jim byla opět odebrána moč. Po shromáždění všech vzorků, byly udělány testy na stanovení množství BPA. Koncentrace BPA na konci očištné fáze byla průměrně 1,2 $\mu\text{g/g}$ kreatininu a na konci intervenční fáze 2,0 $\mu\text{g/g}$ kreatininu. U devíti vzorků z první fáze a tří z druhé fáze byla koncentrace BPA pod detekovatelnou hladinou 0,2 $\mu\text{g/g}$ kreatininu. Přítomnost BPA tedy s používáním polykarbonových lahví vzrostla o 69 %. Touto studií se dokázal více jak dvou třetinový nárůst koncentrace BPA, který souvisí s používáním PC lahví bez ohledu na to, přišel-li člověk do kontaktu s jiným zdrojem BPA (Carwile et al. 2009).

Další studie, která proběhla ve Spojených státech, se zaměřila na měření celkového množství BPA v moči u 2 517 účastníků starších 6 let. Ta hledala souvislosti mezi koncentrací BPA a věkem, rasou, pohlavím a ročním příjmem. BPA byl nalezen u 92,6 % lidí starších 6 let. Koncentrace se pohybovala v rozmezí od 0,4 $\mu\text{g/l}$ do 149 $\mu\text{g/l}$, průměr byl 2,6 $\mu\text{g/l}$. Ženy měly v průměru vyšší koncentraci než muži, taktéž děti od šesti do jedenácti let na tom byli hůře (4,5 $\mu\text{g/l}$) než adolescenti (3,0 $\mu\text{g/l}$) a dospělí (2,5 $\mu\text{g/l}$). Lépe na tom byli i lidé s vyššími příjmy. Co se týče rasy, byli na tom nejlépe mexičtí Američané, pak nehispanští běloši a nehispanští černoši.

Také byla sledována koncentrace v závislosti na času odběru. Geometrický průměr (u dětí, adolescentů a dospělých) byl nejvyšší ve večerních a ranních hodinách. Příčinou je vyšší konzumace jídla a nápojů v těchto denních dobách. Souvislost je nutné hledat i v životním stylu a dietě. Hůř na tom byly opět děti. Příčinou vyšší hladiny BPA v moči je vyšší denní příjem jídla a tekutin vzhledem k hmotnosti těla dětí než u adolescentů a dospělých. Dalším důvodem může být i rozdílná farmakodynamika (Calafat et al. 2008).

Podobná studie proběhla i v letech 2005-2006 a zúčastnilo se jí 2 548 lidí. La Kind a Naiman vypočetli z údajů z této studie denní příjem BPA. Stanovili jej podle rovnice:

$$\frac{\text{koncentrace BPA (ng/ml)} \times \text{objem vyloučené moči (ml/den)}}{\text{hmotnost těla(kg)}} = \text{ng BPA/kg den}$$

Zdroj: La Kind a Naiman (2010)

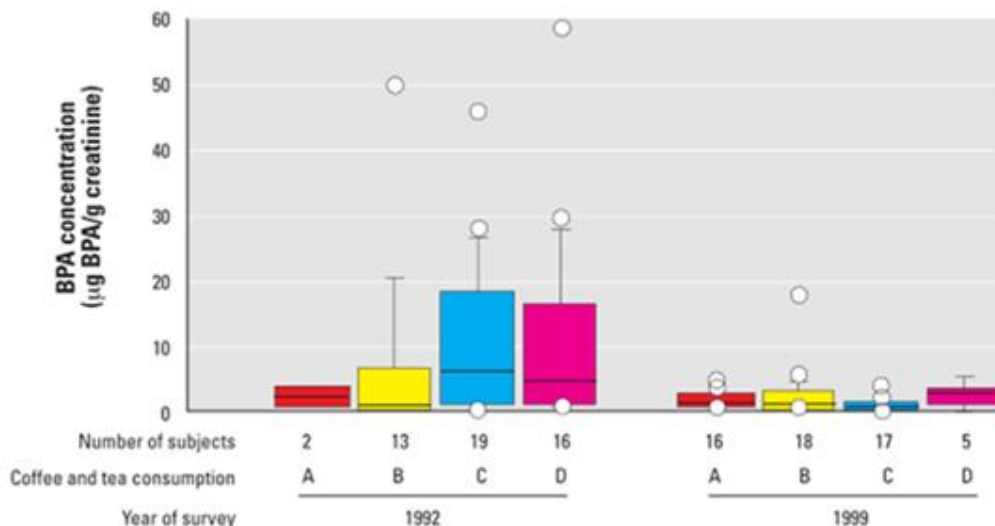
Geometrický průměr odhadovaného denního příjmu BPA vypočteného z koncentrace BPA v moči účastníků studie je znázorněn v tab. 7. Účastníci jsou rozděleni podle pohlaví a věku. Největší příjem BPA je u dětí ve věku od 6 do 11 let a pomalu klesá s rostoucím věkem. Taktéž průměr je významně vyšší u mužů než u žen. Celkově je střední denní příjem pro populaci přibližně 34 ng/kg denně.

Tab. 7: Geometrický průměr odhadovaného denního příjmu BPA [ng/kg/den] vypočteného z koncentrace BPA v moči

	Věk						Pohlaví	
	Celkem	6-11	12-19	20-39	40-59	60 +	Ženy	Muži
Geometrický průměr	35,1	54,0	48,0	38,5	28,9	27,3	31,2	39,6
Velikost skupiny	2535	355	699	583	453	445	1274	1261

Zdroj: La Kind a Naiman (2010)

V letech 1992 a 1999 proběhla v Japonsku studie, která byla zaměřena na měření hladiny BPA v moči studentů. Ačkoli by se dalo předpokládat, že se se zvyšující celosvětovou produkcí bisfenolu A bude narůstat i jeho koncentrace v organismu, nebylo tomu tak. Ve výsledku bylo množství BPA vyšší v roce 1992 a v témž roce bylo také mnohem méně studentů s nedetekovatelnou hladinou (pod 1,7 µg/l nebo 7 nM). V roce 1992 to bylo jen devět lidí z padesáti, tedy 18 %, o sedm let později to bylo 22 lidí z padesáti šesti, což je 39 %. Koncentrace se zvyšovala s rostoucím množstvím zkonsumovaného čaje a kávy. Přestože se studie nezabývala tím, z čeho studenti nápoje konzumují, lze předpokládat, že používali především plastové nádoby a plechovky, jejichž vnitřní vrstvu tvořily epoxidové pryskyřice, jejichž součástí byl i BPA. V devadesátých letech se tyto obaly staly jakýmsi trendem (Matsumoto et al. 2003).



Obr. 5: Grafické znázornění koncentrace konjugovaného BPA mezi studenty v letech 1992 a 1999

Studenti jsou rozdělení do skupin A - D, podle denního množství zkonsumované kávy nebo čaje z plechovek a kelímků, (A) obvykle nic, (B) 0-1, (C) 1-2, (D) více než 3.

Zdroj: Matsumoto et al. (2003)

Nejpravděpodobnějším důvodem poklesu koncentrace BPA v organismu byla změna složení epoxidových pryskyřic a plastů, v nichž se snížilo množství bisfenolu A. Japonské společnosti uskutečnily tuto změnu roku 1997 (Matsumoto et al. 2003).

4.11. Vliv bisfenolu A na organismus

Většina studií, které se zabývali vlivem BPA na organismus, byla prováděna na laboratorních zvířatech nebo lidských tkáních. Malé procento představují studie epidemiologické, např. studie NHANES z let 2003/04 a 2005/06.

Zaznamenán byl vliv BPA na kardiovaskulární systém a vývoj mozku. Změny byly pozorovány také na štítné žláze, slinivce břišní a v tukové tkáni. Tyto změny mohou vést ke zhoršení diabetu a obezity. Dále byl zkoumán vliv na reprodukci a vztah k rakovině prostaty a prsu. V neposlední řadě se sleduje i vliv bisfenolu A na imunitní systém.

4.11.1. Vliv na kardiovaskulární systém

Jedny z největších studií, které se zabývali vztahem BPA a výskytem kardiovaskulárních onemocnění, jsou studie NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), které probíhaly v letech 2003/04 a 2005/06. Celkem se jich účastnilo 2 948 lidí od 18 do 74 let. Hladina BPA v moči byla nižší v letech 2005/06, kdy geometrický průměr dosahoval 1,79 ng/ml, zatímco v letech 2003/04 byl o 30 % vyšší a dosahoval 2,49 ng/ml. Více kardiovaskulárních onemocnění se objevilo v letech 2003/04 (Melzer et al. 2010).

Mechanismus působení BPA na vznik kardiovaskulárního onemocnění nebyl prozatím přesně popsán. Svou roli zde hraje velké množství faktorů. Má se za to, že BPA může způsobovat oxidační stres a poškozovat tím buňky endotelu, interagovat se steroidními receptory, kumulovat lipidy v adipocytech, zvyšovat produkci inzulinu a přispívat k inzulinové rezistenci. Také se zkoumá vliv bisfenolu A na PPAR γ , který má důležitou roli v udržení energetické a lipidové rovnováhy v buňkách a zřejmě také ovlivňuje iontové kanály. Vliv BPA na tento druh receptoru se dále zkoumá (Melzer et al. 2010).

4.11.2. Vliv na vývoj mozku

Protože bisfenol A je pokládán za slabý estrogen, je pozornost při studiu vlivu na mozek soustředěna na estrogen citlivý nervový systém. Největší vliv má na vyvíjející se mozek plodu, který je mnohem citlivější než mozek dospělých. Ve vyvíjejícím se mozku estrogení látky ovlivňují diferenciaci buněk, růst a větvení neuronů, tvorbu synapsí a neurotransmiterů.

Pohlavní dimorfismus

U savců je neuroendokrinní systém pohlavně dimorfní. Dimorfismus je způsoben působením hormonů. Rozdíly jsou ve velikosti, buněčném složení a struktuře mozku. Při vývoji plodu a v období puberty způsobují hormony a jim podobné látky trvalé a nevratné změny v oblastech sexuální diferenciaci v mozku. Estrogení látky tedy mohou reagovat s oblastmi mužského i ženského mozku, které kontrolují a ovlivňují chování obvyklé pro reprodukci, jako je pohlavní chování nebo sociální a nesociální chování. Hlodavci mají 4 sexuálně dimorfní oblasti. Jednou z nich je anterior periventricular nucleus hypothalamu (AVPV) (Castoldi et al. 2010).

AVPV oblast je větší u žen než u mužů. V této oblasti se nachází množství neuronů s produkcí tyrosin hydroxylázy (TH-neurony), která je důležitá při syntéze dopaminu. Ve studii Rubin et al.(2006) byly myši vystaveny 25 ng a 250 ng dávkám bisfenolu A v době od osmého dne gestace až do 16. dne laktace. U samic, které byly vystaveny BPA, došlo ke znatelnému poklesu množství TH-neuronů v porovnání s kontrolní skupinou. Snížení počtu TH-neuronů vedlo k maskulinizaci chování prepubertálních myši vyzorované při testu open field (OFT) (Rubin et al. 2006). Podobnou problematikou se zabývali i Tando et al. (2007), kteří zaznamenali pokles počtu TH-imunoreaktivních neuronů v substantia nigra. Tento pokles byl signifikantní u samic při nízkých dávkách BPA (3 µg), zatímco při vyšších dávkách (8 mg) byl pokles počtu TH- neuronů téměř nezatelný (Tando et al. 2007).

Hyperreaktivita

Vliv BPA na hyperreaktivitu byl prokázán podáváním 0,2 - 20µg BPA myším 5. den po narození. Ve 4. - 5. týdnu od narození byla pozorována zvýšená aktivita v porovnání s kontrolní skupinou. Míra aktivity byla závislá na podané dávce. Příčinou je narušení vývoje dopaminového systému a snížení exprese genu pro dopaminový

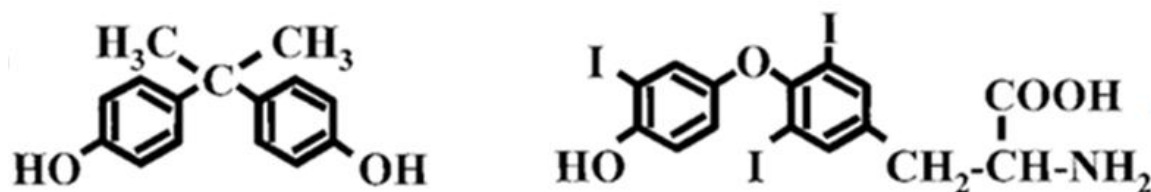
receptor ve 4. týdnu a pro dopaminový transportér v 8. týdnu. Současně dochází k útlumu tyrosin-hydroxylázy, která odštěpuje hydroxyl z L-tyrosinu, a dává tak vzniknout L-DOPA, ze které se stává dekarboxylací dopamin. BPA tedy ovlivňuje aktivitu centrálního dopaminergního systému a jeho utlumením dochází k nárůstu aktivity (Ishido et al. 2004).

Agresivita

BPA podaný při nitroděložním vývoji zvyšuje agresivitu v dospívání. S tímto poznatkem přišel Kawaki a jeho spolupracovníci při podávání 2 a 20 ng/g myším v průběhu jedenáctého až sedmnáctého dne gestace. Agresivita byla zjišťována osmý, dvanáctý a šestnáctý týden po narození. Agresivita byla nejvyšší v osmém týdnu, od dvanáctého týdne nebyly patrné významnější odchylky od kontrolní skupiny (Kawai et al. 2003).

4.11.3. Vliv na štítnou žlázu

Bisfenol A díky své strukturní podobnosti s thyroxinem a trijodthyroninem působí jako jejich kompetitivní antagonist. Může tedy narušit funkci hormonů tím, že brání vazbě trijodthyroninu na thyroideální receptor a utlumí jeho transkripční aktivitu. Genová suprese je přičítána vlivu BPA na komplex N-CoR - TR, kdy BPA znemožňuje uvolnění jaderného korepresoru (N-CoR), a tím aktivaci transkripce. BPA může poškodit normální funkci štítné žlázy už v perinatálním období, což může vést až k mentální retardaci (Moriyama et al. 2002).



Obr. 6. Strukturní podobnost bisfenolu A s trijodthyroninem

Dva benzenové cykly jsou spojené uhlíkem nebo kyslíkem. BPA obsahuje dvě hydroxylové skupiny a T₃ hydroxylovou skupinu a alanin

Zdroj: Moriyama et al. (2002)

Podle Zoeller et al. (2005) způsobuje vystavení potkanů v prenatálním období bisfenolu A zvýšení hladiny tyroxinu v krvi a zvyšuje také expresi neurograninových (RC3) receptorů v hippocampu (v gyrus dentatus) 15. den po narození mláďat. Tento den je citlivost genu pro neurogranin nejvyšší. Důvodem zvýšené hladiny T_4 je antagonistické působení BPA na β -TR. Hypothalamus nedostává tak negativní zpětnou vazbu a nesnižuje se uvolňování TRH a ani není ovlivněna hladina TSH. Bisfenol A neovlivňuje α -TR, který řídí expresi genu pro RC3. α -TR reagují na zvýšenou hladinu T_4 , a dochází tak k lokálnímu hyperthyroidismu, který způsobuje nárůst RC3 mRNA. Exprese genu RC3/neurogranin je ovlivňována právě hladinou TH (Zoeller et al. 2005).

Další výzkum se zaměřil na možnost kompetice při vazbě BPA, T_4 a T_3 na transportní proteiny thyroidálních hormonů – lidský sérový albumin (HSA), transthyretin (TTR), thyroxin vázající globulin (TBG). BPA má sice schopnost se navázat na tyto proteiny, ale jeho afinita k nim je nižší, než je u T_3 a T_4 . V množství, v jakém se vyskytuje v plazmě, nemůže narušovat transport těchto hormonů (Cao et al. 2011).

4.11.4. Vliv na pankreas

Bisfenol A přímo působí na tvorbu a uvolňování insulinu z izolovaných buněk Langerhansových ostrůvků a výrazně ovlivňuje hladinu inzulinu v krvi. Ačkoli je BPA pokládán za slabý estrogen, svými účinky na β buňky pankreatu se vyrovná 17β -estradiolu. Jsou-li buňky vystaveny dlouhodobému působení těchto látek, dochází k zvýšení obsahu β buněk, zvýšené genové expresi insulinu a jeho uvolňování. Takováto dlouhodobá produkce insulinu je zprostředkována aktivací $ER\alpha$.

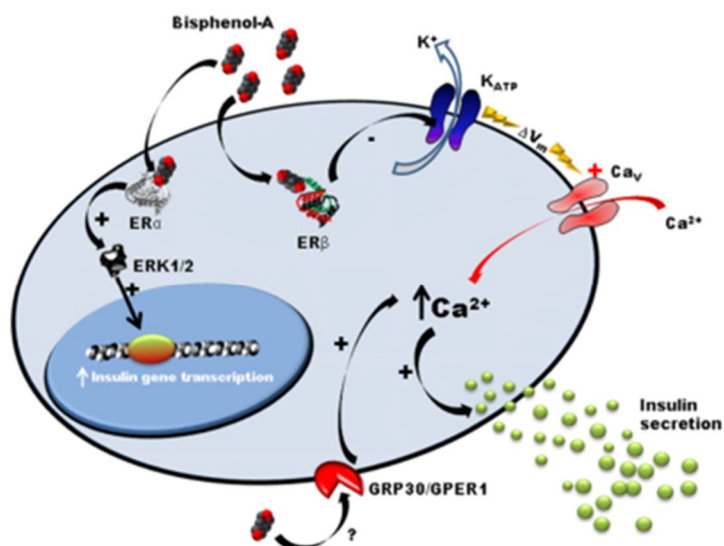
Bisfenol působí na α i β endogenní receptory. Jeho vazba na ně je asi 10 000 až 100 000krát slabší než u E_2 . Přesto 1 nM BPA vyvolá stejný efekt jako působení 1 nM E_2 . Při podávání vyšších dávek BPA se produkce insulinu nemění. Oba typy receptorů jsou přítomny jak v jádře, tak v cytoplasmě (Alonso-Magdalena et al. 2008, Soriano et al. 2012).

$ER\alpha$ reaguje při dlouhodobě zvýšené hladině estrogenních látek v organismu. Aktivován je především v období těhotenství, kdy je zvýšená hladina estadiolu v krvi. Podobně jako estradiol působí BPA. Po navázání bisfenolu A na $ER\alpha$ dochází k aktivaci ERK1/2 kinázy, která spustí genovou transkripci (Alonso-Magdalena et al. 2008).

Po navázání BPA na ER β dochází k rychlé aktivaci ATP dependentních draselných kanálků, které se uzavřou. Zvýší se koncentrace K $^{+}$, dojde k depolarizaci membrány a otevřou se Ca $^{2+}$ kanálky. Po vstupu Ca $^{2+}$ nastává exocytóza granul s insulinem. Při pokusech na izolovaných myších pankreatech, BPA působí na draselné kanálky už za 7 minut po aplikaci a zvyšuje jejich aktivitu v průměru o 49,3 %. Na lidském pankreatu bylo pozorováno uzavírání draselných kanálků už po 5 minutách od aplikace BPA a jejich aktivita poklesla až o 83,4 %. Přitom bylo vypořováno, že 1 nM BPA stimuluje glukózou navozenou sekreci inzulínu, která je dvakrát tak velká než uvolňování inzulínu při stimulaci samotnou glukózou o koncentraci 8 nM (Soriano et al. 2012).

Dalšími receptory, které jsou stimulovány při zvýšené hladině estrogenů, jsou GPR30/GPER1. Tyto receptory patří do široké rodiny nspecifických membránových receptorů ncmER. GPER1 receptory také vážou BPA a jsou zodpovědné za rychlé uvolňování inzulínu stejně jako ER β . Při dlouhodobém podávání BPA laboratorním zvířatům se u nich vyvinula hyperinsulinémie a s ní související insulinová rezistence a obezita (Ropero et al. 2008, Soriano et al. 2012).

Obr. 7 popisuje působení BPA na jednotlivé typy receptorů v pankreatu a následný mechanismus spuštění transkripce nebo uvolnění granul s insulinem.

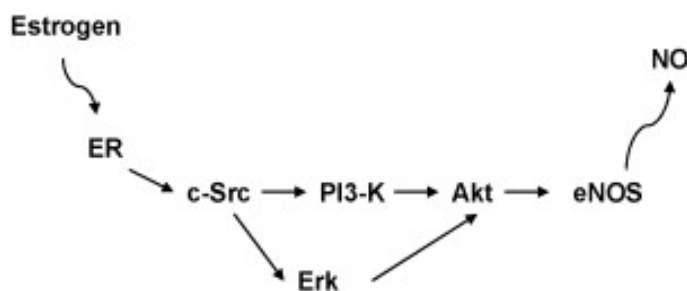


Obr. 7: Působení bisfenolu A na β buňku pankreatu

Zdroj: Soriano et al. (2012)

BPA ovlivňuje také uvolňování glukagonu z α buněk pankreatu. Způsobuje utlumení otevírání Ca^{2+} kanálků, které reagují na nízkou koncentraci glukózy v krvi. 1 nM BPA způsobuje totální utlumení až 50 % α buněk a u zbylých se snižuje frekvence otevírání Ca^{2+} kanálků. BPA působí přes některý z ncmER a následně dochází ke spuštění jedné ze dvou alternativních cest, jejichž výsledkem je uzavření vápenatého kanálku.

Obr. 8 popisuje cesty od aktivace ER až po uvolnění oxidu dusnatého. Jedna z cest je přes Src/PI3kinázu/Akt a druhá přes Src/Ras/ERKs. Obě pak vedou k aktivaci syntázy oxidu dusnatého (NOS), která stimuluje uvolnění NO a aktivaci guanylyl cyklázy (GC). Ta zvyšuje koncentraci cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), utlumí proteinkinázu G (PKG) a dojde k utlumení iontových kanálů (Alonso-Magdalena et al. 2005).



Obr. 8: Alternativní cesty popisující uvolnění oxidu dusnatého při aktivace estrogenního receptoru

Zdroj: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720709002226>

4.11.5. Vliv na tukovou tkáň

Jednou ze studií, která se zabývala vlivem BPA na adipocyty, byla studie od Kidani et al. (2010). Výzkumníci použili myší adipocyty linie 3T3-L1, které byly kultivovány s BPA (20-80 μM) po dobu 24 h. V kontrolním vzorku byla koncentrace DNA adiponektinu v buňce 49,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a v médiu 35,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Vzorky s obsahem BPA vykazovaly na dávce závislé uvolňování adiponektinu. Největší pokles produkce byl při koncentraci 80 μM , kdy se snížil obsah buněčného adiponektinu o 60 % a mimobuněčného o 56 %. Při koncentraci nad 80 μM nedošlo k výraznější změně v syntéze adiponektinu.

Součástí této studie bylo také vypořádat vliv BPA na signální dráhu PI3K-Akt, která je aktivována po navázání insulínu a následně se podílí na regulaci genové exprese

adiponektinu. Bylo vyzorováno, že v médiu s BPA došlo k snížení hladiny Akt a jeho fosforylované formy p-Akt oproti mediu bez BPA a poklesla tak i tvorba adiponektinu (Kidani et al. 2010).

V prosinci roku 2008 proběhla studie, která se zabývala srovnáním vlivu bisfenolu A a estradiolu na vylučování adiponektinu z lidských buněk tukové tkáně prsu, podkožních a viscerálních tukových buněk. Vzorky tkání byly získány při chirurgických zákrocích, jako je zmenšování prsu, abdominoplastika nebo při bypassu žaludku. Současně se také sledovala změna v expresi mRNA jednotlivých receptorů.

Při testování buněk tukové tkáně prsu bylo zjištěno, že BPA tlumí uvolňování adiponektinu jen v dávkách menších než 1 nM, zatímco působení estradiolu je závislé na dávce a s rostoucí dávkou se inhibice zvyšuje. Suprese bisfenolen je ale v dávkách pod 1 nM účinnější než u estradiolu. Testy na abdominálních a subkutánních buňkách měly podobné výsledky v účinku BPA, ale působení estradiolu již nebylo závislé na dávce.

Zkoumán byl také vliv bisfenolu A na receptory, jako jsou ER α , ER β , GPR30, ERR α , ERR β a ERR γ . Všech šest receptorů bylo exprimováno více v tukové tkáni prsu než ve VIS nebo SC. Více byl exprimován ER α než ER β , a to hlavně v tukové tkáni prsu než ve viscerální nebo subkutánní tkáni. (Hugo et al. 2008)

4.11.6. Vliv na imunitu

Bisfenol A ovlivňuje imunitní systém přes estrogenní receptory, arylhydrokarbonový receptor a přes PPAR (peroxisom proliferator-activated receptor). BPA je schopen ovlivnit proliferaci T buněk imunitního systému a ovlivnit jejich diferenciaci na Th1 nebo Th2. Prováděné studie se ale liší ve směru diferenciaci. V některých studiích jako je např. studie Youn et al. (2002), Yoshino et al. (2004, 2003) došlo ke větší diferenciaci ve prospěch Th1 lymfocytů.

Youn et al. (2002) kultivovali lymfocyty odebrané z myši, které dostávaly po dobu 4 týdnů BPA o koncentraci 0,015, 1,5 a 30 mg/l v pitné vodě, s concavalinem A. Bylo pozorováno zvýšení množství splenocytů, ale tělesná váha a hmotnost sleziny byly nezměněny. Nebyly zjištěny ani změny v množství T buněk, B lymfocytů ani NK buněk. Zvýšilo se ale množství INF- γ , který je produkován Th1, a snížilo se množství IL-4, který byl pod detekovatelnou hladinou. IL-4 je produkován Th2.

Protože množství INF- γ bylo zvýšené, lze předpokládat, že diferenciaci T lymfocytů probíhá ve prospěch Th1. (Youn et al. 2002)

K podobným výsledkům dospěl i Yoshino et al. (2003), ale s tím rozdílem, že nedocházelo ke snížení IL-4. Oba cytokiny byly zvýšeny. Ve studii z roku 2003 se autoři zaměřili na vliv BPA na produkci Th1 nebo Th2 lymfocytů. Myším byl podán intraperitoneálně lysozym ze slepičích vajec (HEL) a následně jim byl podáván BPA po dobu dvaceti dnů. Splenocyty analyzované od nultého do dvacátého dne expozice vykazovaly zvýšenou proliferaci, anti-HEL IgG2a, IgG1 a cytokinů INF- γ a IL-4, a to především v dávce 3 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (Yoshino et al. 2003) O rok později se autoři zaměřili na vliv BPA v prenatálním období, kdy březím myším podávali BPA a jejich potomky pak 77. den od narození imunizovali HEL. O tři týdny později se zkoumala odpověď buněk sleziny na HEL. Kromě koncentrace INF- γ a IL-4 se sledovalo i množství IgG2a, jako indikátoru Th1 buněk a IgG1 jako indikátoru Th2 lymfocytů. Došlo ke zvýšení obou zmíněných cytokinů, ale koncentrace INF- γ byla znatelně vyšší, a to až o 200 %. Nárůst protilátky anti-HEL IgG2a byl závislý na dávce. Při nejvyšší dávce BPA (3 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) byl nárůst množství protilátek anti-HEL IgG2a vyšší o 134 % a protilátek anti-HEL IgG1 vyšší o 51 % (Yoshino et al. 2004). V obou studiích byla výrazně zvýšena koncentrace INF- γ .

Naopak mnoho jiných studií podává důkazy o zvýšení množství Th2 lymfocytů. Lee et al. (2003) zjistil, že podávání BPA o koncentraci 10 – 50 μM zvyšuje u antigenem aktivovaných T buněk produkci IL-4. K Th2 dominantní imunitní odpovědi dochází i v případě, že jsou bisfenolu A vystaveny dendritické buňky v době svého zrání. Za přítomnosti BPA a TNF- α dochází ke zvýšení CCL1 (chemokin ligand 1), který je produkován T buňkami. CCL1 je chemokin zodpovědný za přitahování monocytů, B buněk, NK a dendritických buněk do místa zánětu. Dendritické buňky vystavené BPA a TNF- α produkují více IL-10, který navozuje Th2 diferenciaci. (Guo et al. 2010)

Zatím ještě není zcela jasné, proč se výsledky studií, kde CD4+ buňky byly vystavené BPA, tolik různí. Důležitou roli zřejmě hraje koncentrace BPA, délka působení a doba expozice. To, že BPA ovlivňuje diferenciaci Th1/Th2 může vést k zánětlivým onemocněním. Zvýšení Th2 může vést k alergickým reakcím a astmatu, zatímco Th1 k roztroušené skleróze. (Rogers et al. 2013)

Inadera et al. (2000) se zabývali vlivem estrogenů a xenoestrogenů na monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Jedná se o chemoatraktant, který přitahuje

monocyty z krve na místo působení, v tomto případě do nádorových buněk prsu linie MCF-7. Bylo zjištěno, že BPA inhibuje interleukinem-1 (IL-1) navozenou produkci tohoto MCP-1 enzymu, a to až o 3 - 4 řády více než estradiol. Narušena je transkripce v místě vazby transkripčního faktoru NF- κ B na promotor RNA polymerázy. Nedochozí k syntéze MCP-1 proteinu, a monocyty tak nejsou přitahovány do místa nádorového bujení. (Inadeta et al. 2000)

Makrofágy produkují oxid dusnatý (NO) a tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α). BPA na uvolňování těchto látek nepůsobí přímo, ale až po stimulaci lipopolysacharidem (LPS). Je-li organismus vystaven vyšším dávkám LPS a současně zvýšené koncentraci BPA kolem 50 μ M, nedochází ke zvýšené produkci cytokinů a volných radikálů. Při dávkách 25 μ M bylo stále ještě pozorováno potlačení LPS navozené produkce NO. (Yoshitake et al 2008) A stejným způsobem byla potlačena i sekrece TNF α při dávkách od 10 do 100 μ M. (Byun et al. 2005) Naopak při nižších dávkách BPA (43 nM) došlo k LPS indukovanému zvýšení uvolňování NO. (Hong et al. 2004)

4.11.7. Vliv na samčí pohlavní orgány a produkci spermatu

V roce 1998 Frederic vom Saal a jeho kolegové publikovali jednu z prvních studií, ve které se zaměřili na sledování vlivu BPA na reprodukční orgány a na produkci spermií u samců myši, kteří byli při nitroděložním vývoji vystaveni dávkám tohoto xenoestrogenu. BPA byl podáván březím myším po sedm dnů od jedenáctého do sedmnáctého dne nitroděložního vývoje. Mezi jedenáctým a dvanáctým dnem gestace se vyvíjejí varlata, probíhá morfologická diferenciacce a začíná produkce testosteronu. Vývoj přídatných reprodukčních orgánů se odehrává od patnáctého až šestnáctého dne nitroděložního vývoje. Samci, kterým bylo v průběhu fetálního období podáváno 20 ng/g BPA, vykazovali v dospělosti 20% pokles produkce spermií. BPA také ovlivňuje vývoj nadvarlat a semenných váčků, které jsou po podávání 2 ng/g BPA méně vyvinuté. Naopak prostata a žláza předkožky se zvětšily, a to až o 35 %. (vom Saal et al. 1998)

Podobnou problematikou se zabýval i Al-Hiyasat et al. (2002), který ale nezkoumal vliv BPA na plod, ale na dospělé jedince. Samcům byly podávány dávky 5, 25 a 100 ng/kg po dobu 30 dnů, poté byli odděleni a dáni ke dvěma samicím po dobu 10 dnů. Po uplynutí této doby byli samci usmrceni a deset dnů na to byly usmrceny i samice. Zde se sledoval počet březích samic, implantačních míst,

životaschopných zárodků a počet resorpcí, u samců pak počet spermií a váha reprodukčních orgánů. Absolutní váha semenných váčků byla nižší o 5 a 25 ng/kg, ale při dávce 100 ng/kg se nelišila od kontrolních vzorků. Absolutní váha varlat byla nižší jen u dávky 5 ng/kg, jinak relativní váha vzrostla, ale znatelně jen při dávce 25 ng/kg. Váha žlázy předkožky nebyla ovlivněna. Počet spermií byl nižší u všech tří koncentrací, ale výrazný pokles nastal především u dávek 25 a 100 ng/kg. Počet oplodněných samic znatelně kles a zvýšil se počet resorpce zárodků. (Al-Hiyasat et al. 2002)

Bylo prokázáno, že BPA ovlivňuje tvorbu testosteronu ze Sertoliho a Leydigových buněk, čímž snižuje i produkci spermií. Protože tvorba testosteronu v Leydigových buňkách je potlačena, není zpětnovazebně regulována produkce hormonů z hypothalamo-hypofyzární osy. Zvyšuje se produkce luteinizačního hormonu (LH), který by měl ve varlatech stimulovat tvorbu testosteronu. Dále dochází ke zvyšování uvolňování prolaktinu z adenohipofýzy a to přímým působením bisfenolu A. Kdyby nebyl současně s prolaktinem uvolňován i LH, hrozil by rozvoj hyperprolaktémie. Pokles LH však nebyl zaznamenán, naopak sekrece byla zvýšena jako odpověď na snížení sekrece testosteronu. BPA také snižuje testikulární koncentraci inhibinu, ale celková koncentrace v plasmě zůstává stejná. Nedochází tedy ke zvýšení hladiny folikulostimulačního hormonu (FSH). (Tohei et al. 2001)

Tyto a ještě mnohé další studie spolehlivě dokazují, že BPA může zasáhnout do vývoje pohlavních orgánů během nitroděložního vývoje, snížit produkci testosteronu a tím i spermií a ovlivnit tak plodnost a schopnost reprodukce u myší.

4.11.8. Vliv na vznik rakoviny prostaty

Karcinom prostaty tvoří asi 4 % ze všech nádorových onemocnění. Jeho incidence je asi 60 případů na 100 000 obyvatel. Tímto druhem rakoviny je postiženo 10 % evropské populace. V ČR je výskyt tohoto onemocnění neustále na vzestupu, od devadesátých let stoupl o 70 %. Nejčastěji postihuje muže nad 70 let. (<http://nemoci.vitalion.cz/rakovina-prostaty/>)

Při stárnutí dochází v prostatě k postupnému snižování tvorby fosfodiesterázy 4, která je důležitá pro štěpení cAMP. Tato signální molekula reguluje buněčný růst a diferenciaci. Příčinou snižování produkce enzymu je metylace kódujícího genu fosfodiesterázy 4 varianty 4 (PDE4D4). Dochází-li k postupné metylaci PDE4D4 a snižování produkce enzymu, nedochází k nádorovému bujení, protože není snižováno

množství cAMP a buňka není nadále podporována v růstu a diferenciaci. V nádorových buňkách prostaty bylo zabráněno methylaci PDE4D4, a proto v nich byla hladina fosfodiesterázy vyšší a hladina cAMP nižší, což vedlo k abnormálnímu růstu buněk. Příčinou tohoto stavu mohou být estrogény, jejichž koncentrace se s přibývajícím věkem u mužů zvyšuje. (Ho et al. 2006)

Ho et al. (2006) se zabývali vlivem různých dávek estrogenu a bisfenolu A na prostatu. Studie byla prováděna na CD potkanech, kteří byli v průběhu 1., 3. a 5. dne po narození vystaveni nízkým (0,1 µg/kg), nebo vysokým (2,5 µg/kg) dávkám estrogenu a nízkým dávkám bisfenolu A (10 µg/kg). V dospělosti potkanů, tedy po 90-ti dnech, byl vždy půlce z jednotlivých skupin podán implantát s testosteronem a estradiolem a druhé půlce skupiny implantát prázdný. 28. týden byla zvířata usmrcena. Bylo zjištěno, že vystavení nízkým dávkám BPA v prvních dnech po narození a v dospělosti dávkám testosteronu a estrogenu vede k zvýšení počtu neoplastických lézí prostaty oproti kontrolním skupinám. Stejného výsledku bylo dosaženo i při podávání vysokých dávek estrogenu. Tato studie tedy dokazuje, že vystavení estrogenům a xenoestrogenům v dětství zvyšuje náchylnost k pre-neoplastickým lézím v průběhu stárnutí. Navíc dochází mnohem dříve k poruše methylace genu. V této studii se objevily změny už desátý den po narození. Je tedy možné sledováním hladiny fosfodiesterázy 4 poměrně v brzké době rozpoznat riziko vzniku rakoviny prostaty. (Ho et al. 2006, Prins et al. 2008)

4.11.9. Vliv na nástup puberty a estrálního cyklu

Nástup puberty začíná u myších samic otevřením poševního vchodu. Otevření poševního vchodu je vlastně apoptický děj, který začíná při zvýšené sekreci estradiolu. U myši může tento děj nastat až deset dnů před prvním estrálním cyklem, obvykle v rozmezí 25. - 30. dne od narození (Caligioni 2009, Rodriguez et al. 1997, Nelson et al. 1982). Prenatálně podávané dávky BPA navozují dřívější otevření poševního otvoru, stejně tak i BPA podaný osmý den od narození. BPA také narušuje estrální cyklus tím, že prodlužuje dobu estru nebo metestru. V kontrolní skupině došlo k prodloužení estru/metestru jen u přibližně 37 % myší po dobu čtyř a více dní, zato BPA vyvolal tento stav u 55,74 % myší, kterým bylo prenatálně podáváno 25 µg/kg, a u 55,56 %, kterým bylo podáváno 250 µg/kg. Estrus/metestrus trval u myší vystavených BPA mnohem déle než u kontrolní skupiny (Markey et al. 2003). Prodloužení estru souvisí

s poruchou tvorby folikulů navozenou BPA. Pokles frekvence estrálního cyklu znamená snížení fertility (Nah et al. 2011).

4.11.10. Vliv na vývoj oocytů

Odhaduje se, že 10 až 25 % lidských oplodněných oocytů je aneuploidních. Tyto numerické chromozomální odchylky vedou k potratům, vrozeným vývojovým vadám nebo mentální retardaci. Jednou z možných příčin tak častých chyb při meióze může být vystavení endokrinním disruptorům. (Hunt et al. 2003) K narušení meiózy může dojít jak při fetálním vývoji, tak při pozdějším expozici bisfenolem A. Tento předpoklad potvrdily studie od Susiarjo et al. (2007) a Hunt et al. (2003), které prokázaly, že i nízké dávky BPA mohou narušit meiózu při vývoji oocytu

Při nitroděložním vývoji BPA narušuje první meiotické dělení a vznik oocytů prvního řádu. Nejvíce defektů bylo nalezeno v profázi, především v pachytene. V této fázi došlo k nárůstu synaptických abnormalit u skupiny, které byl podáván bisfenol. Počet synaptických aberací se vyšplhal až na 52 %, zatímco u kontrolní skupiny byly aberace jen z 16 %. Mezi nejčastější poškození patří nekompletní synapse, kdy nedošlo k vytvoření synapse mezi homologními chromozomy a vzniku bivalentu, nebo došlo ke shlukování telomer dvou nebo více chromosomů k sobě, tzv. end-to-end asociace. Bisfenol A tedy narušuje charakteristické pohyby chromosomů v profázi. Příčinou je interakce BPA s ER β . (Susiarjo et al. 2007)

Hunt et al. (2003) se zabýval vlivem BPA na meiózu při vývoji oocytu. Testy byly prováděny na myších v době od 20. do 22. dne po narození, tedy ještě v prepubertálním období. Dávky 20, 40 a 100 ng/g byly podávány orálně po dobu 6 - 8 dnů v době konečného zrání folikulu. Přestože BPA byl podáván jen ve velmi nízkých dávkách po relativně krátkou dobu, došlo k ovlivnění reprodukčních funkcí. Bylo vyzorováno, že BPA narušuje průběh meiózy v anafázi, kde ovlivňuje segregaci chromosomů. Přesný mechanismus však prozatím není známý, zřejmě se jedná o narušení funkce mikrotubulů. Bisfenolem A vyvolané chromosomální defekty snižují kvalitu předávaného genetického materiálu a mohou být příčinou transgeneračních defektů. Citlivost na BPA se zřejmě zvyšuje s věkem, neboť u šesti a osmi měsíčních myší byla nondisjunkce ztelně vyšší než u předpubertálních samic. (Hunt et al. 2003)

4.11.11. Vliv na vývoj prsních žláz

Výskyt rakoviny prsu za posledních několik desítek let stále roste. V ČR je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním žen. V roce 2009 bylo nově diagnostikováno 5 975 případů, což představuje 111,7 případů na 100 000 žen. (Dušek et al. 2012) Jednou z příčin vzniku rakoviny prsu je i vystavení endogenním disruptorům jak v průběhu interauterinního života, tak i po narození.

Vliv BPA na vývoj prsní žlázy CD-1 myši zkoumali Markey et al. (2001). Sledovali vývoj prsní žlázy po vystavení dávce 25 a 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA od devátého do dvacátého dne gestace. Výsledky byly vyhodnoceny po 10 dnech, jednom měsíci a po šesti měsících od narození. Po deseti dnech nebyly patrné žádné odchylky od standardů, velikost duktálního stromu byla stejná. Po měsíci od narození nastává období puberty a prsní žlázy se začínají vyvíjet. V tomto období dochází k růstu duktů. Prorůstají za oblast lymfatických uzlin a postupují do tukového polštáře. Rychlejší růst byl u myši vystaveným dávce 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pak následuje kontrolní skupina a nejpomalejší růst byl při 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Markey et al. 2001). Důvodem takto rychlého růstu může být snížená apoptická aktivita.

Po třiceti dnech nebyly vyzorovány změny v expresi ER, které jsou umístěny jak v epitelální, tak i vazivové tkáni. Výrazně navýšen byl jen počet receptorů na progesteron (PR), které se nachází v epitelální tkáni. V okolí duktů byly vyzorovány větší shluky PR, jedná se o místa budoucího větvení duktů. Pro větvení je důležitý mediátor Wnt4. Jedná se o protein kódovaný stejnojmenným genem, který podporuje ženský sexuální vývoj a je důležitý pro laterální větvení duktů. Jeho zvýšená exprese byla pozorována při dávce 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. BPA má tedy vliv na expresi PR, a tím i na větvení duktů (Muñoz-de-Toro et al. 2005).

Po šesti měsících byly prsní žlázy plně vyvinuty. U myši, kterým byl podáván BPA, došlo k mnohem většímu vývoji duktů, terminálních duktů, lobulů a alveolárních pohárků. Dukty byly větší o 29 a 25 %, terminální dukty o 237 a 219 % a podobně velký nárůst byl i u lobulů a alveolárních pohárků. Navíc u myši vystavených dávce 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bylo o 60 % více alveolů, které obsahovaly sekreční produkty (Markey et al. 2001).

Mechanismus, kterým BPA ovlivňuje morfologii a sekreční funkce prsních žláz, není ještě zcela znám. BPA zřejmě přímo ovlivňuje genovou expresi a také působí na hypothalamo-hypofyzární osu, jejíž hormony ovlivňují vývoj prsní tkáně.

Vystavení BPA má za důsledek poruchu v načasování syntézy DNA v epiteliální a vazivové tkáni, která je patrná až po delší době od expozice (Markey et al. 2001).

Prenatální vystavení BPA také zvyšuje incidenci preneoplastických lézí v pozdějším věku. Příčinou malignit může být větší citlivost prsních žláz na estrogeny vyvolaná v prenatálním vývoji při expozici BPA. Tento předpoklad potvrzuje i studie od Durando et al. (2007). Potkanům vystavených v prenatálním období BPA byla následně podána 50. den od narození dávka 25 µg/kg N-nitroso-N-methylurei (NMU). Takto nízká dávka je považována za subkarcinogen. Znatelný nárůst hyperplasií duktů v porovnání s kontrolní skupinou, která nebyla vystavena BPA, byl pozorován 110. a 180. den. Vystavení BPA tedy zvyšuje citlivost prsních žláz ke karcinogenům a vede ke vzniku nádorového onemocnění (Durando et al. 2007).

4.11.12. Vliv na placentu

Estrogen je důležitým hormonem pro těhotenství. Reguluje pohyb hladkých svalů při pohybu embrya vejcovodem a stimuluje jeho implantaci do dělohy. BPA působí zcela opačně. Tím, že se váže na estrogenní receptory, zřejmě snižuje motilitu hladké svaloviny ve vejcovodech a snižuje také možnost uchycení embrya v děloze, což nakonec vede ke snížení počtu embryí v těhotenství (Tachibana et al. 2007).

Vliv BPA na placentu byl zkoumán při podávání 10 mg/kg/den březím myším od nultého do sedmého dne gestace. Desátý a dvanáctý den gestace bylo se standardem porovnáno množství embryí, hmotnost dělohy a vliv na vývoj placenty. Velikost placenty je oproti kontrolní skupině menší. Placenta je celkově tenčí, ale dochází ke zvětšení metrial gland. BPA pravděpodobně působí hlavně ve vazivových buňkách a způsobuje jejich hyperplasiu, a tím i zvětšení metrial gland. Trofoblast nebyl dostatečně vyvinut zřejmě proto, že se v něm nenachází ER, a tak BPA na něj nemá přímý vliv. BPA se s největší pravděpodobností váže v jiných buňkách a narušuje cytokininovou síť, která pomáhá při rozvoji trofoblastu. Je-li vývoj trofoblastu zpomalen, netvoří se v něm cévní síť nutná pro přejímání živin od matky pro plod. Také dochází ke snížení množství buněk obsahujících glykogen a ztenčení spongiofoblastu (Tachibana et al. 2007).

BPA tedy snižuje motilitu vejcovodů, snižuje možnosti nidace vajíčka, vývoj placenty a je schopný přes placentu přecházet do plodu. Tím vším se snižuje plodnost, zvyšuje se potratovost a snižuje se také přežívání neonatálních myší.

Ve studii Tachibana et al. (2007) přežilo do 56. dne od narození 100 % narozených myší z kontrolní skupiny, ale ve skupině, které byl podáván BPA, došlo během tří dnů od narození k úmrtí dvou třetin jedinců, 56. dne se nedožil žádný (Tachibana et al. 2007).

Při prenatálním vystavení samic BPA dojde ke snížení plodnosti, která je závislá na podané dávce (Cabaton et al. 2011). Současně při prenatálnímu vystavení myší dochází i k dřívějšímu navození puberty, změně v estrálním cyklu, zvýšené expresi ER α a progesteronových receptorů v endometriu.

U myší, kterým bylo podáváno 25 a 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{denně}$, došlo k 4 a 5-ti násobnému nárůstu ER α v luminálních buňkách epitelu dělohy (Cabaton et al. 2011).

5. ANTIMON

Další rizikovou látkou, která se uvolňuje z plastových lahví, je antimon. Používá se jako katalyzátor ve formě oxidu antimonitého (Sb_2O_3) při výrobě polyethylentereftalových lahví. Katalyzuje proces polymerizace tereftalové kyseliny a ethylenglykolu (Westerhoff et al. 2008). Na jeden kilogram PET je použito 100 - 300 miligramů antimonu (Hanse et al. 2010). Katalyzátor na bázi antimonu se využívá proto, že je levný, má vysokou katalytickou aktivitu a nízkou tendenci katalyzovat vedlejší reakce. Používá se přibližně u 90 % vyrobených lahví (Westerhoff et al. 2008, Well 2011). Existují i další katalyzátory, které by při výrobě PET bylo možné použít, např. katalyzátor na bázi titanu nebo germania, ale z důvodu finanční náročnosti tomu tak není (Westerhoff et al. 2008).

Antimon se postupně uvolňuje do obsahu lahví. K většímu uvolňování přispívá hlavně zvýšená teplota, kyselé pH a vystavení slunečním paprskům.

5.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Antimon je stříbrošedý, lesklý a velmi křehký polokov, který patří do stejné periodické skupiny jako arsen. Má s ním podobnou toxicitu. Slovo antimon pochází z řečtiny ze spojení slov „anti“ a „monos“, což v překladu znamená „proti samotě“.

V přírodě se antimon vyskytuje většinou jako doprovodný kov v rudách bismutu, olova a mědi, ale i jako ryzí. Většina antimonových sloučenin se vyskytuje jako trojmocné nebo pětímocné sloučeniny. Tab. 9 znázorňuje základní fyzikální a chemické vlastnosti antimonu.

Nejčastěji se vyskytující sloučeniny antimonu jsou slabě až mírně rozpustné ve vodě. Sloučeniny antimonu mají velmi rozsáhlé použití. Nejvíce se využívají do slitin s olovem při výrobě baterií. Přidávají se do tiskařských barev, aby barva byla jasná a tisk byl co nejostřejší. Používají se jako zpomalovače hoření do lepidel, plastů a textilií. Sloučeniny našly rovněž uplatnění i při výrobě skla, v metalurgii a sváření. Ve farmacii se využívají jako pigmenty a ve zdravotnictví se uplatňují při terapii leishmianiasy a schistosomiasy (<http://www.chemicool.com/elements/antimony.html>).

Tab. 9: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti antimonu

Chemická značka	Sb
Protonové číslo	51
Relativní atomová hmotnost	121,760
Perioda a skupina	5, V.A
Oxidační stavy	-III, III, IV, V
Teplota tání	630,79°C
Teplota varu	1587°C
Hustota při 20°C	6,684 g/cm ³
Elektronegativita	2,05

Zdroj: (<http://www.chemicool.com/elements/antimony.html>)

Věty o bezpečnosti:

- R 37 Dráždí dýchací orgány
- R 34 Způsobuje poleptání
- R 51/53 Toxický pro vodní organizmy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí
- R 20/22: Zdraví škodlivý při vdechování a při požití.
- R 36/37/38 Dráždí oči a dýchací orgány a kůži
- R 36/38 Dráždí oči a kůži

Pokyny pro bezpečné zacházení s chemikálií:

- S 60 Tento materiál a jeho obal musí být zneškodněn jako nebezpečný odpad.
- S61 Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Viz speciální pokyny nebo bezpečnostní listy
- S36/37/39: Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít
- S26 Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.

(http://www.chemicalbook.com/CASEN_7440-36-0.htm)

5.2. Toxicita

Toxicita antimonu je závislá na podané dávce, době expozice, cestě podání, oxidačním čísle antimonu, věku, pohlaví, výživě člověka, životním stylu a zdravotním stavu. Oxidační stav III je asi desetkrát toxičtější než stav V a také se více podobá toxicitě arsenu. (Janovský 2009.)

Většinu informací o toxicitě antimonu získáváme od lidí, kteří mu byli vystaveni při výkonu svého povolání. Tehdy dochází hlavně k inhalaci nebo kontaktu s pokožkou.

Při inhalační expozici se vdechuje buď přímo plyn, jakým je třeba stilben, nebo prachové částičky ve vzduchu obsahující trichloridy, pentachloridy, trioxidy a trisulfidy antimonu. Akutní intoxikace chloridovými sloučeninami antimonu se projevuje rinitidou a při častější expozici i plicním edémem. Při chronickém vystavení dochází k poškození dýchacích cest (rinitida, faryngitida, tracheitida) a také k bronchitidě, pneumokonióze a plicnímu emfyzému. (Goyer a Clarkson 2008)

Akutní orální intoxikace antimonem (Sb^{3+}) se projevuje kovovou pachutí v ústech, nevolností, zvracením, břišními křečemi, průjmem a celkovou slabostí. Může se vyskytnout i zápach z úst po česneku. Dále se objevuje charakteristická vyrážka. Jedná se o bílé skvrnky, které se vyskytují v místech se zvýšeným výskytem potních žláz. Trojmocné ionty jsou více toxické než pětimocné a působí kardiotoxicky. Dochází k arytmiím, poškození myokardu, srdečnímu selhání až zástavě srdce. Také působí hepatotoxicky. První příznaky intoxikace se objevují do třiceti minut až dvou hodin, záleží na dávce. (<http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid40.htm>, Winship 1987.)

Opakované orální vystavení nižším dávkám antimonu se projevuje dušností, snížením váhy, vypadáváním vlasů, bolestí hlavy, poruchou spánku a periferní neuropatií. Mohou nastat i poruchy reprodukce a poškození chromozomů. Sloučeniny antimonu jsou tedy potencionálně toxické pro reprodukci a mohou mít i mutagenní a onkogenní potenciál. Součeniny antimonu by tedy neměly být užívány v období těhotenství a také při onemocnění ledvin, jater a srdce. Dochází-li k dlouhodobé kumulaci, pak jsou projevy intoxikace podobné intoxikaci arsenem (<http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid40.htm>, Winship 1987).

Při kontaktu s očima způsobuje podráždění. Může dojít i k poškození očního nervu. Při kontaktu s kůží způsobí iritaci a svědění. Charakteristická

vyrážka se objevuje až při dlouhodobé expozici (<http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid40.htm>).

Při studiích prováděných na potkanech a myších byla pozorována dřívější úmrtnost, zvýšení cholesterolu a krevního cukru, a to především u samic (Schroeder et al. 1970). Při podávání dávek od 0,5 do 500 $\mu\text{g/l}$ po dobu devadesáti dnů došlo k histopatologickým změnám na štítné žláze, játrech a slezině. Tyto změny byly jen minimální. Hladina antimonu ve tkáních byla závislá na dávce. Nejvíce antimonu bylo v červených krvinkách, pak ve slezině, játrech, ledvinách, mozku, tuku a séru. U potkanů, kterým byly podávány nejvyšší dávky antimonu, došlo ke snížení příjmu tekutin o 35 % (Poon et al 1998).

5.3. Tolerovaný denní příjem

První referenční dávka pro orální podání antimonu byla stanovena až roku 1991 organizací US EPA. Její hodnota byla stanovena na 0,4 $\mu\text{g/kg}$ tělesné váhy denně. Podkladem pro tuto hodnotu byla studie od Schröder et al. (1970), kdy potkanům byl podáván vinan antimonito-draselný o dávce 0,35 $\mu\text{g/kg/den}$. Tato dávka představovala nejnižší dávku, při které byl pozorován škodlivý účinek na potkany. WHO stanovila roku 1993 tolerovanou denní dávku na 0,86 $\mu\text{g/kg/den}$. O deset let později se TDI změnila. Hodnota byla odvozena ze studie Lynch et al., který stanovil NOAEL na 0,06 mg/kg/den . TDI pro antimon je 6 $\mu\text{g/kg/den}$. (Antimony in Drinking-water)

5.4. Limity antimonu v lahvích

Limit pro obsah antimonu ve vodě je v EU 5 $\mu\text{g/kg}$, v USA a Kanadě 6 $\mu\text{g/kg}$, v Japonsku 15 $\mu\text{g/kg}$. WHO stanovila limit na 20 $\mu\text{g/kg}$. Tyto limity platí pro vodu ještě před tím, než je napuštěna do plastových lahví (Westernhoff et al. 2007). Problémem je, že antimon se z lahví uvolňuje. Množství, které se z plastu může uvolnit, je stanoveno v Nařízení komise EU č. 10/2011 ze dne 14. ledna 2011 o materiálech a předmětech z plastů, určených pro styk s potravinami. Podle věstníku Evropské unie je hodnota SML pro obalové výrobky potravin stanovena na 40 $\mu\text{g/kg}$ (Nařízení komise EU č. 10/2011). V Japonsku je SML 50 $\mu\text{g/kg}$, v USA není limit stanoven. (Welle a Franz 2011)

5.5. Mechanismus účinku

Mechanismus účinku antimonu není ještě zcela znám, ale je zřejmě velmi podobný arsenu. Arsen působí na SH-skupiny bílkovin, které blokuje a inhibuje tak enzymatickou aktivitu (Toxicological profile for antimony and compounds).

5.6. Farmakokinetika

5.6.1. Absorpce

Rozpustnost oxidu antimonitého v žaludeční šťávě je relativně nízká. Je to jen 20 mg/l za 24 hodin. Při per orálním podání sloučenin antimonu se vstřebává jen velmi malá část z podané dávky. U zvířat jen 5-15 % (Antimony in Drinking-water).

5.6.2. Distribuce

Trojmocná forma antimonu se do organismu absorbuje mnohem rychleji než pentavalentní. V krvi se naváže na červené krvinky. Takto je distribuováno 90 % antimonu (III). Distribuční poločas je půl hodiny. Zvýšené množství trojmocného antimonu se kumuluje v játrech, srdci a štítné žláze.

Pentavalentní antimon se v krvi váže na krevní plasmu a usazuje se hlavně v kostech.

Ke kumulaci antimonu dochází v játrech, ledvinách, kostech, štítné žláze, slezině a v plicích. V těhotenství přechází přes placentární bariéru a hromadí se v plodu a plodové tekutině. Přechází také do mateřského mléka (Antimony in Drinking-water).

5.6.3. Metabolismus

Antimon je kov, nepodléhá tudíž katabolismu (Toxicological profile for antimony and compounds).

5.6.4. Exkrece

Trivalentní sloučeniny antimonu se z organismu vylučují žlučí do střev. Pouze 25 % z podané dávky se vyloučí močí. Naopak pentavalentní sloučeniny se vylučují převážně ledvinami. Mají nižší afinitu k buňkám, proto jsou vylučovány rychleji.

Více než 95 % pentavalentního antimonu je z organismu odstraněno během 24 hodin. Jeho eliminační poločas je 2 - 4 hodiny (Antimony in Drinking-water).

5.7. Analytické metody pro stanovení antimonu

Antimon může být stanoven mnoha spektrálními metodami. Nejpoužívanější metodou stanovení antimonu je hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou. Jejimi hlavními výhodami je nízké riziko interferencí a vysoká citlivost přístroje. Ten dokáže stanovovat i stopové a ultrastopové koncentrace antimonu. Mezi další často využívané analytické metody patří:

- atomová absorpční spektrometrie splamenovou atomizací,
- atomová absorpční spektrometrie s křemennými atomizátory,
- atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem,
- atomová fluorescenční spektrometrie.

Tyto analytické metody nám umožní stanovit celkové množství antimonu ve vzorku, ale nevypovídají o jeho chemických formách. Proto, abychom mohli stanovit i jednotlivé formy antimonu, je nutné použít separační techniky, jako je HPLC a GC. Až poté je možno použít detekci spektrálními metodami (Janovský 2009, Rychlovský 2008).

5.8. Antimon v balené vodě

Westerhoff et al. (2008) se zabývali měřením uvolněného antimonu do obsahu plastových lahví na vodu v závislosti na čase, teplotě, pH a záření. K tomu použili 9 značek balených vod. Cílem této studie bylo zjistit množství uvolněného antimonu při skladování v podmínkách jihozápadní oblasti USA. V této oblasti Spojených států je spotřeba balené vody větší a teploty při skladování vyšší.

Průměrná koncentrace antimonu na začátku studie byla $0,195 \pm 0,116 \mu\text{g/l}$ a po třech měsících venkovního uskladnění při 22°C se zvýšila na $0,226 \pm 0,160 \mu\text{g/l}$. Protože láhev číslo 9 uvolňovala nejvyšší koncentrace antimonu, prováděly se další testy na tomto typu lahve (Westernhoff et al. 2007).

Protože pH balené vody se pohybuje v rozmezí od 6 do 8, nebylo v takto úzkém rozmezí detekováno výrazné kolísání koncentrace antimonu. Jiné to bylo u teploty.

Na jihozápadě USA se teplota vzduchu pohybuje i nad 45 °C, v autech a garážích může překročit 60°C. Zahřátí vody na 80 °C po dobu 48 hodin zvýšilo koncentraci antimonu u lahve č. 9 (Arrowhead) z 0,5 na víc než 7 µg/l. Po sedmi dnech uskladnění při této teplotě se koncentrace antimonu vyšplhala až na 14,4 µg/l (Westernhoff et al. 2007).

U vody ochlazené na -20°C nedošlo k žádné významné změně koncentrace antimonu v porovnání s kontrolními vzorky.

UV záření zvýšilo koncentraci na 2 – 3 µg/l za 6 hodin. Sluneční záření má ale jen malý vliv na uvolňování antimonu. Při ponechání lahve na slunci se současně zvyšuje i teplota, která je hlavní příčinou migrace antimonu. Aby se zjistila účinnost UV na migraci, byla společně s touto lahví pořízena i kontrolní láhev. Ta ale byla zabalena do hliníkové folie, aby se eliminoval vliv UV. Ve výsledku došlo pouze k 5 – 10% nárůstu koncentrace antimonu oproti kontrolní lahvi (Westernhoff et al. 2007).

Podobnou problematikou se zabýval Keresztes, který zkoumal uvolňování antimonu z lahví s obsahem perlivé a neperlivé vody. K většímu uvolňování docházelo v lahvích s perlivou minerální vodou. Vliv na zvýšené uvolňování antimonu do perlivé vody má samo zřejmě pH, které je z důvodu zvýšeného obsahu HCO_3^- nižší. Pohybuje se v rozmezí 4,94 – 5,27, zatím co pH neperlivé vody je blízké neutrálnímu a pohybuje se v rozmezí 6,3 – 8,12 (Keresztes et al. 2009).

Koncentrace antimonu měřená v ovocných džusech v PET lahvích se pohybovala v rozmezí od 0,28 do 1,05 µg/l. Koncentrace se zvyšovala s blížícím se datem spotřeby a i po něm. Antimon má vysokou afinitu k hydroxylovým a karboxylovým skupinám. Proto v džusech, kde je vysoký obsah citrátů, je schopen tvořit komplexy Sb-acetát a Sb-citrát. V ovocných džusech se tedy antimon může vyskytovat jak volný, tak vázaný v komplexu s citráty (Hansen a Pergantis 2006).

5.9. Vliv na zdraví

Množství antimonu uvolněného z lahví je zanedbatelné. Tolerovaný denní příjem pro člověka stanovený WHO je 6 µg/kg/den, což pro 60 kilového člověka představuje 360 µg antimonu denně. Konzumuje-li člověk 3 litry denně a každá láhev obsahuje 1,2 µg/kg, jedná se pouze o 1 % TDI (BAG 2005). Ani ve studii Westernhoff et al. (2007) se z plastových lahví neuvolnila taková dávka, aby ohrozila zdraví jedince. Množství uvolněné z lahví je tedy zanedbatelné a vliv takto malého množství na zdraví nebyl zaznamenán.

6. DISKUSE

Bisfenol A se z plastových výrobků uvolňuje ve velmi nízkých koncentracích, řádově v nanomolech až mikromolech. I tyto malé dávky však mohou mít negativní vliv na zdraví. Bisfenol A patří mezi endokrinní disruptory, jejichž účinek se může projevit až po několika letech od expozice, nebo také vůbec ne.

Naprostá většina studií, které se zabývaly vlivem nízkých dávek bisfenolu A na organismus, pracovaly se zvířecími modely. Studie prokázaly škodlivý vliv této látky na jejich organismus. Získané výsledky je však dost obtížné porovnat, neboť v naprosté většině případů se podávaly nestejné dávky bisfenolu A různým druhům zvířat v různých etapách jejich života. Z toho důvodu je možné, že se studie budou ve svých výsledcích lišit a nelze je objektivně srovnávat. Rovněž je diskutabilní, zda by tyto látky působily stejně i na člověka.

Endokrinní disruptory nepůsobí vždy stejné změny. Příkladem může být vliv BPA na imunitu, kde vědci došli k rozporuplným závěrům ohledně diferenciaci T lymfocytů na Th1 a Th2 buňky. Směr diferenciaci byl pravděpodobně ovlivněn velikostí podané dávky, dobou expozice, věkem a dalšími faktory.

Námětem pro další studii by mohl být vliv bisfenolu A na PPAR γ receptory, které působí na imunitní systém a pravděpodobně také ovlivňují kardiovaskulární systém, kde narušují energetickou rovnováhu buněk.

Vzhledem k počtu studií, které prokazují škodlivý vliv nízkých dávek BPA na organismus, by stálo za úvahu se zamyslet nad snížením limitu TDI pro tuto látku.

Diskutabilní by mohla být i laxnost našich zákonodárců k přijetí Směrnice komise 2011/8/EU, která zakázala od 1. března výrobu a od 1. června uvádění a dovoz kojeneckých lahví s obsahem polykarbonátů. Do národní legislativy byla tato směrnice přijata s dvouměsíčním zpožděním.

U antimonu jsem se potýkala s nedostatkem studií, které by popisovaly vliv nízkých dávek antimonu na organismus při orálním podání. Vzhledem k tomu, že antimon není na rozdíl od bisfenolu A endokrinní disruptor, platí pro něj toxikologické pravidlo, které předpokládá, že negativní účinek se projeví jen při překročení stanoveného limitu. S dávkami pod tímto limitem je organismus schopen se vypořádat sám. Možná to bylo důvodem, proč se vědci tímto tématem nezaobírali.

7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo shromáždit dostupné poznatky o problematice rizikových látek uvolňujících se z plastových lahví a jejich vlivu na organismus při orálním podání.

Produkce plastových výrobků neustále narůstá a setkáváme se s nimi doslova na každém kroku, a to už od kojeneckého věku.

Ne každý plast, z kterého se lahve vyrábí, je však dostatečně inertní na to, aby neuvolňoval obsahové látky do tekutiny v lahvi. Proto jsem věnovala první kapitole charakteristice látek, z kterých jsou lahve vyrobeny. Za nejméně závadné lze považovat lahve vyrobené z HDPE, LDPE a PP. Naopak za potenciálně nebezpečné jsou pokládány výrobky z PC a PVC. Lahve z PET lze zařadit také mezi ty relativně bezpečné, ale nesmí se používat opakovaně.

Nejvíce diskutovanou látkou, u které byl prokázán škodlivý vliv na organismus je bisfenol A, kterému je věnována další kapitola. Bisfenol A byl sice zkoumán už ve třicátých letech dvacátého století pro svou podobnost s estrogenními látkami, ale v terapii nebyl nikdy použit. Rozsáhlejší uplatnění našel až v padesátých letech při výrobě plastů. Dnes se jeho světová produkce pohybuje kolem tří miliónů tun ročně a stále narůstá.

Bisfenol A se za určitých okolností z plastů uvolňuje. Jedním z důvodů následného uvolňování je chyba v polymerizačním procesu, kdy nezreaguje všechen bisfenol a volné molekuly mohou postupně migrovat. Dalším důvodem je hydrolyza esterové vazby, na kterou má vliv zejména teplota a pH.

Přestože množství, které se uvolňuje z plastových výrobků, je nepatrné, může dlouhodobý příjem dávek BPA vést ke změnám v organismu. Na organismus působí prostřednictvím receptorů, ovlivňuje činnost aromátázy a vyvolává také epigenetické změny v DNA. Ve své práci se zabývám studii, které prokazují účinek nízkých dávek bisfenolu A na kardiovaskulární systém, vývoj mozku, štítnou žlázu, pankreas, tukovou tkáň, imunitu a na samčí a samičí pohlavní orgány.

Další látkou, která se z plastů uvolňuje, je antimon. Používá se při výrobě PET lahví jako katalyzátor. Jeho uvolňování napomáhá zvýšená teplota, kyselé pH a UV záření.

Toxické účinky antimonu jsou popsány pouze v dávkách, které překračují NOAEL. Projevy intoxikace antimonu jsou popsány v kapitole Toxicita. Pod tímto limitem se jeho působení na organismus neprokázalo, respektive nedohledala jsem žádné studie, které by popisovaly při orálním podání vliv mikromolárních dávek na organismus.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) Al-Hiyasat AS, Darmani H, Elbetieha AM. Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *Eur J Oral Sci.* 2002;110:163–7.
- 2) Alonso-Magdalena P, Larbi O, Ropero AB, Fuentes E, Ripoll C, Soria B, Nadal A. 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. *Environ. Health Perspect.* 2005;113:969–977.
- 3) Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquié M, Gauthier BR, Nef S, Stefani E, Nadal A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One.* 2008;3: e2069.
- 4) *Antimony element facts – Chemicool Cooler Than Absolute Zero!* [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.chemicool.com/elements/antimony.html>
- 5) *Antimony in Drinking-water - Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.* 2003. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=antimony%20in%20drinking-water&source=web&cd=2&ved=0CEMQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fwater_sanitation_health%2Fdwq%2Fchemicals%2Fantimony.pdf&ei=ffWEUdvDC4fasgaG5oCQDA&usg=AFQjCNHiL2JiBz3aT4AQcoYjmZbfj4xQg&bvm=bv.45960087,d.Yms
- 6) Aschberger K, Castello P, Hoekstra E, Karakitsios S, Munn S, Pakalin S, Sarigiannis D. Bisphenol A and baby bottles: challenges and perspectives. 2010, 16.
- 7) BAG 2005. Antimon in Mineralwasser: Beurteilung des Gesundheitsrisikos. Bulletin 44/05. Bundesamt für Gesundheit. Switzerland. 796-797.
- 8) Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2010;202: 393 e391–397.
- 9) *Bellis M. The History of Plastics - Timeline of Plastics.* *About.com.* [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://inventors.about.com/od/pstartinventions/a/plastics.htm>.

- 10) Bílková Zuzana. (Bio)senzory pro sledování hormonálně aktivních látek (endokrinních disruptorů) v prostředí. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Brno. 2011.
- 11) *Bisphenol A - A Safety and Handling Guide*. [online].1997. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.bisphenol-a.org/pdf/BPAsafe.pdf>
- 12) *Bisphenol A* [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.bisphenol-a.org/about/bpa-info/bpa-synthesis.html>
- 13) *Bisphenol A* [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.bisphenol-a.org/human/polyplastics.html>
- 14) *Bisphenol A Action Plan - U.S. Environmental Protection Agency*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: http://www.epa.gov/opptintr/existingchemicals/pubs/actionplans/bpa_action_plan.pdf
- 15) Brede C, Fjeldal P, Skjevraak I, Herikstad H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Additives and Contaminants* 2003;20:684–689.
- 16) Byun JA, Heo Y, Kim YO, Pyo MY. Bisphenol A-induced downregulation of murine macrophage activities in vitro and ex vivo. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Volume 19, Issue 1, 2005,19–24
- 17) Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, Askenase MH, Gadbois JL, Tharp AP, Whitt GS, Sonnenschein C, Soto AM. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect*. 2011 Apr;119(4):547-52.
- 18) Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the US population to bisphenol A and 4tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ Health Perspect*. 2008;116:39.
- 19) Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr. Protoc. Neurosci*. 2009;48, A41.1–A41.8.
- 20) Cao J, Guo L-H, Wan B, Wei Y. In vitro fluorescence displacement investigation of thyroxine transport disruption by bisphenol A. *Journal of Environmental Sciences*. 2011;23(2):315–321
- 21) Cao J, Stieger B, Meier PJ, Vore M. Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 2002;283:G757–G766.

- 22) Cao XL. *Background Paper on Chemistry and Analytical Methods for Determination of Bisphenol A in Food and Biological Samples - FAO/WHO Expert Meeting on Bisphenol A (BPA)*. [online].2010. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/1_chemistry_analytical_methods.pdf
- 23) Carwile JL, Luu HT, Bassett LS, Driscoll DA, Yuan C, Chang JY, Ye X, Calafat AM, Michels KB. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect*. 2009;117:1368–72.
- 24) Castoldi AF, Patisaul HB, Aungst JL. *Background Paper on Neurotoxic, Neuroendocrine and Neurobehavioural Effects of Bisphenol A, FAO/WHO Expert Meeting on Bisphenol A (BPA)*. 2010. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/7.5_neurobehavioural_neurotoxic_and_neuroendocrine_effects.pdf.
- 25) Csanády G, Oberste-Frielinghaus H, Semder B, Baur C, Schneider K, Filser J. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Archives of Toxicology*. 2002;76(5-6):299–305.
- 26) Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13056–13061.
- 27) Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto AM, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect*. 2007;115:80–86.
- 28) Dušek L, Abrahámová J, Májek O, Daneš J, Mužik J, *Stručný přehled epidemiologie karcinomu prsu v České republice. 2012*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.mamo.cz/index.php?pg=pro-lekare--epidemiologie-karcinomu-prsu#incidence-prevalence>.
- 29) *European Food Safety Authority – Bisphenol A* [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/afc070129.htm>
- 30) Fišera R., Králík M. Katalyzátory na báze organických polymérov ich výhody a nevýhody, príprava a priemyselné aplikácie. *Chemické listy*, 1997,91,421–426.
- 31) *Fujan R. Reusing Plastic Bottles Can Pose Serious Health Hazards. About.com*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: http://environment.about.com/od/healthenvironment/a/plastic_bottles.htm.

- 32) Goyer RA, Clarkson TW. Toxic Effects Of Metals. In: Curtis D. Klaassen, Ph.D, edit. Casarett And Doull's Toxicology - The Basic Science Of Poisons. Seventh edition. 2008. Cap.23.853.
- 33) Guo H, Liu T, Uemura Y, Jiao S, Wang D, Lin Z, Narita Y, Suzuki M, Hirosawa N, Ichihara Y, Ishihara O, Kikuchi H, Sakamoto Y, Senju S, Zhang Q, Ling F. Bisphenol A in combination with TNF-alpha selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity. *Cell Mol. Immunol* 2010;7(3):227–234.
- 34) Hansen HR, Pergantis SA. Detection of antimony species in citrus juices and drinking water stored in PET containers. *J Anal At Spectrom.* 2006;21:731–733.
- 35) Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research.* 2006;66(11):5624–5632.
- 36) Hong CC, Shimomura-Shimizu M, Muroi M, Tanamoto K. Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by mouse macrophages. *Biol Pharm Bull.* 2004;27:1136–1139.
- 37) Hrubá D. Endokrinní disruptory. *Hygiena, Praha: Státní zdravotní ústav, 2009, roč. 54, č. 1, s. 23-26.*
- 38) Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW, Jonathan NB. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect.* 2008, 116:1642–1647.
- 39) Hulinková Petra. Modulace dioxinového, estrogenního a androgenního receptoru nekoplanárními PCB. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno. 2009.15-17.
- 40) Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, Thomas S, Thomas BF, Hassold TJ. Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr. Biol.* 2003;13:546–553.
- 41) *Chemical book – CAS DataBase List* [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5854419.htm
- 42) *Chemicalbook – Antimony CAS 7440-36-0.* [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/CASEN_7440-36-0.htm

- 43) Inadera H, Sekiya T, Yoshimura T, Matsushima K. Molecular analysis of the inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression by estrogens and xenoestrogens in MCF-7 cells. *Endocrinology*. 2000;141:50–59.
- 44) Inoue H, Tsuruta A, Kudo S, Ishii T, Fukushima Y, Iwano H, Yokota H, Kato S. Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metab Dispos* 2005;33(1):55–59.
- 45) Inoue H, Yuki G, Yokota H, Kato S. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metabolism and Disposition*. 2003;31(1):140–144.
- 46) Ishido M, Masuo Y, Kunimoto M, Oka S, Morita M. Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *J Neurosci Res* 2004;76: 423–433.
- 47) *Jak správně třídit plasty – Tespra Hodonín s.r.o.* [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: http://www.tespra-hodonin.cz/soubory/jak_spravne_tridit/jak_tridit_plast.pdf
- 48) Janovský Radek. Průnik antimonu do potravního řetězce člověka. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Technologická fakulta. Zlín, 2009. 10-16,34.
- 49) Jordáková I, Dobiáš J, Voldřich M, Poustka J: Determination of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol A diglycidyl ether and bisphenol F diglycidyl ether migrated from food cans using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Czech J. Food Sci.*, 21;2003;85–90.
- 50) Kawai K, Nozaki T, Nishikata H, Aou S, Takii M, Kubo C. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 2003;111: 175–178.
- 51) Keresztes S, Tatar E, Mihucz VG, Virag I, Majdik C, Zaray G. Leaching of antimony from polyethylene terephthalate (PET) bottles into mineral water. *Sci Total Env*. 2009;407:4731–4735.
- 52) Kidani T, Kamei S, Miyawaki J, Aizawa J, Sakayama K, Masuno H. Bisphenol A downregulates Akt signaling and inhibits adiponectin production and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Jurnal of atherosclerosis and thrombosis*. 2010, Vol. 17 No.8
- 53) Kim JY, Han EH, Kim HG, Oh KN, Kim SK, Lee KY, Jeong HG. Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular Leydig cells. *Toxicol Lett*. 2010;193:200–8.

- 54) Kim YH, Kim CS, Park S, Han SY, Pyo MY, Yang M. Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312:441–8.
- 55) Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, Gauthier BR, Lalonde K, Lalonde PJ. Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2009;26:928–937.
- 56) La Kind JS, Naiman DQ. Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005–2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2010; 21;272–279.
- 57) Lawley R, Curtis L, Davis J. *The Food Safety Hazard Guidebook.* 2008. Str. 307-310.
- 58) Lee MH, Chung SW, Kang BY, Park J, Lee CH, Hwang SY, Kim TS. Enhanced interleukin-4 production in CD4⁺ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca²⁺ *Immunology.* 2003;109:76–86.
- 59) *Making polycarbonate – The Macrogalleria.* [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.pslc.ws/macrog/level4.htm>.
- 60) Markey CM, Coombs MA, Sonnenschein C, Soto AM. Mammalian development in a changing environment: Exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev.* 2003;5:1–9.
- 61) Markey CM, Luque EH, Munoz de Toro MM, Sonnenschein C, Soto AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 2001;65:1215–1223
- 62) Marták Radek. Obalové materiály vhodné pro použití v potravinářském průmyslu. Bakalářská práce. Vysoké uční technické v Brně, Chemická fakulta, Brno, 2008. 14-20.
- 63) Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K, Isse T, Oyama T, Foureman GL, Morita M, Kawamoto T. Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect.* 2003;111:101–104.
- 64) Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2002;110(2):193–6.

- 65) Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. Association of urinary bisphenol A concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One*. 2010;5:e8673.
- 66) Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:5185–5190.
- 67) Mountfort KA, Kelly J, Jickells SM, Castle L. Investigations into the potential degradation of polycarbonate baby bottles during sterilization with consequent release of bisphenol A. *Food Additives and Contaminants* 1997;14:737–740.
- 68) *MRP2 – Slovo Biotechnology*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.solvobiotech.com/transporters/mrp2>
- 69) Muñoz-de-Toro M, Markey CM, Wadia PR, Luque EH, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 2005;146: 4138–4147.
- 70) Nah WH, Park MJ, Gye MC. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. *Clin Exp Reprod Med*. 2011;38:75–81.
- 71) *Nariadení komise (EU) č. 10/2011 ze dne 14. ledna 2011 o materiálech a předmětech z plastů určených pro styk s potravinami*. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 15.1.2011, L 12/1, CS. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:012:FULL:CS:PDF>
- 72) *National Institute of Environmental Health Sciences – Endocrine disruptors*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/>
- 73) *National Poisons Information Service – Antimony*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid40.htm>
- 74) Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod*. 1982;27:327–339.
- 75) Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environmental Health Perspectives* 2010;118:1196–1203.

- 76) Owen J. *Bottled Water Isn't Healthier Than Tap, Report Reveals*. In: *National geographic news*. February 24, 2006. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: http://news.nationalgeographic.com/news/2006/02/0224_060224_bottled_water_2.html.
- 77) Pant J, Deshpande SB. Acute toxicity of bisphenol A in rats. *Indian J Exp Biol*. 2012 Jun;50(6):425-9.
- 78) *Plastic – the Facts 2012*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics-the-facts-2012.aspx?Page=DOCUMENT&FoIID=2>.
- 79) Poon, R., I. Chu, P. Lecacavier, V. E. Valli, W. Foster, S. Gupta, and B. Thomas.. Effects of antimony on rats following 90-day exposure via drinking water. *Food Chem. Toxicol*.1998. 36:21-35.
- 80) Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagan SZ, and Waechter JM Jr. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci* 2000;54:3–18.
- 81) Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2008;102(2):134–138.
- 82) *Přehled recyklačních značek – Magistrát města Plzně, Technický úřad, Odpady*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://odpady.plzen.eu/mesto-a-odpady/prehled-recyklacnich-znacek.aspx>
- 83) *Recyklační symboly – Hustopeče, Odpady*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.hustopece-city.cz/zivotni-prostredi/odpady/co-by-ste-jeste-meli-vedet/>
- 84) Rodriguez I, Araki K, Khatib K, Martinou JC, Vassalli P. Mouse vaginal opening in an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2. *Dev Biol*. 1997;1997;184:115–121.
- 85) Rogers JA, Metz L, Yong VW. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol*. 2013 Apr;53(4):421-30
- 86) Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Garcia-Garcia E, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *Int J Androl*. 2008;31:194–200.

- 87) Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology*, 2006, 147:3681–3691.
- 88) Rychlovský Petr. *Moderní analytické metody v geologii, kapitola Prvková analýza a speciace*. 2008. 15-23. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Moderni%20analyticke%20metody%20v%20geologii.pdf>.
- 89) Senjen R, Azoulay D, překlad do češtiny Příbylová J. Slastná nevědomost o bisfenolu A: důvody ke změně přístupu k chemickým látkám: komplexní přehled dostupných evropských vědeckých poznatků o kontroverzní látce bisfenol A (BPA). 2008.6-7.
- 90) Shimizu K, Kontani S, Yamada S, Takahashi G, Nishiyama T, Satsuma A. Design of active centers for bisphenol-A synthesis by organic–inorganic dual modification of heteropolyacid. *Applied Catalysis A: General Volume 380, Issues 1–2*, 2010;33-39.
- 91) Schroeder, H.A., M. Mitchner and A.P. Nasor. Zirconium, niobium, antimony, vanadium and lead in rats: Life term studies. *J. Nutr.* 1970.100(1): 59-68
- 92) Schug TT., Vogel SA., Vandenberg LN., Braun JM., Hauser R., Taylor JA., Vom Saal FS. Heindel JJ. Bisphenol A, in *Dioxins and Health: Including Other Persistent Organic Pollutants and Endocrine Disruptors*, Third Edition (ed A. Schecter), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. 2012;ch12 s 382-384.
- 93) *Slíva Jiří – Receptory pro estrogen a strukturně obdobné molekuly*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: www.levret.cz/publikace/casopisy/mb/2010-19/?pdf=103
- 94) *Směrnice Komise 2011/8/EU ze dne 28. ledna 2011, kterou se mění směrnice 2002/72/ES, pokud jde o omezení používání bisfenolu A v plastových kojeneckých láhvích*. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 29.1.2011. L 26/11, CS. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:CS:PDF>
- 95) Snyder RW, Maness SC, Gaido KW, Welsch F, Sumner SCJ, Fennell TR. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000;168(3):225–234.

- 96) Soriano S, Alonso-Magdalena P, Garcia-Arevalo M, Novials A, Muhammed SJ, Salehi A, Gustafsson JA, Quesada I, Nadal A. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PloS One* 2012;7: e31109.
- 97) Susiarjo M, Hassold TJ, Freeman E, Hunt PA. Bisphenol a exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet.* 2007;3:e5.
- 98) Tachibana T, Wakimoto Y, Nakamuta N, Phichitraslip T, Wakitani S, Kusakabe K, Hondo E, Kiso Y. Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice. *Journal of Reproduction and Development.* 2007;53(3):509–514.
- 99) Tando S, Itoh K, Yaoi T, Ikeda J, Fujiwara Y, Fushiki S. Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development. *Brain Development,* 2007,29:352–356.
- 100) Taylor JA, Richter CA, Ruhlen RL, vom Saal FS. Estrogenic environmental chemicals and drugs: Mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* Volume 127, Issues 1–2, 2011;83–95.
- 101) Thaddeus T. Schug, Sarah A. Vogel, Laura N. Vandenberg, Joe M. Braun, Russ Hauser, Julia A. Taylor, Frederick S. vom Saal, and Jerold J. Bisphenol A. In: Schechter A eds, *Dioxins and Health: Including Other Persistent Organic Pollutants and Endocrine Disruptors*, Third Edition. 2012. Kapitola 12, 381-384.
- 102) Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;102:175–179.
- 103) Tohei A, Suda S, Taya K, Hashimoto T, Kogo H. Bisphenol A inhibits testicular functions and increases luteinizing hormone secretion in adult male rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226:216–21.
- 104) *Toxicological profile for antimony and compounds - Agency for Toxic Substances and Disease Registry U.S. Public Health Service.* 1992. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=antimony%20is%20a%20metalloid%20catabolism&source=web&cd=4&ved=0CFAQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.atsdr.cdc.gov%2Ftoxprofiles%2Ftp23.pdf&ei=YfaEUYOMDY_Aswa9toHICQ&usg=AFQjCNFd8ZpMCp9mT5lCnfRiHdv3PGBItQ&bvm=bv.45960087,d.Yms.

- 105) *University of Minnesota – Bisphenol A*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://enhs.umn.edu/current/2008studentwebsites/pubh6101/bpa/history.html>.
- 106) *US FDA - Guidance for Industry: Preparation of Premarket Submissions for Food Contact Substances: Chemistry Recommendations 2007*. [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm081818.htm>
- 107) Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev.* 2009;30:75–95.
- 108) Vogel SA - The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a “safety”. *Am J Public Health* 99 Suppl 2009; 3S559–566.
- 109) Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998;14:239–260.
- 110) *Vyhláška ze dne 28. července 2008, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb., o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmu, ve znění pozdějších předpisů. In: Sbíрка zákonů, 2008, částka 89* [online]. [cit. 2013-01-04]. Dostupné z: <http://www.mvcr.cz/soubor/sb090-08-pdf.aspx>
- 111) Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL, Alyea RA. Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids* 2007;72:124–134.
- 112) Welle F, Franz R. Migration of antimony from PET bottles into beverages: determination of the activation energy of diffusion and migration modelling compared with literature data. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2011 Jan;28(1):115-26.
- 113) Westerhoff P, Prapaipong P, Shock E, Hillaireau A. Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. *Water Res.* 2008;42:551–556.
- 114) Winship KA. Toxicity of antimony and its compounds. *Adverse Drug React Acute Poisoning Rev.* 1987;6(2):67-90.
- 115) Wolstenholme JT, Rissman EF, Connelly JJ. The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Horm Behav.* 2011;59(3):296–305

- 116) Wong KO, Leo LW, Seah HL. Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles. *Food Additives & Contaminants*. 2005;22:280–288.
- 117) Xu LC, Sun H, Chen JF, Bian Q, Qian J, Song L, Wang XR. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology*. 2005;216:197–203.
- 118) Yamamoto T, Yasuhara A. Quantities of bisphenol A leached from plastic waste samples. *Chemosphere*. 1999;38(11):2569–76.
- 119) Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, Yuasa A. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J*. 1999;340(Pt 2):405–9.
- 120) Yoshino S, Yamaki K, Li X, Sai T, Yanagisawa R, Takano H, Taneda S, Hayashi H, Mori Y. Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice. *Immunology*. 2004;112:489–495.
- 121) Yoshino S, Yamaki K, Yanagisawa R, Takano H, Hayashi H, Mori Y. Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice. *Br J Pharmacol*. 2003;138:1271–1276.
- 122) Yoshitake J, Kato K, Yoshioka D, Sueishi Y, Sawa T, Akaike T, Yoshimura T. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: Involvement of estrogen receptor-dependent or -independent pathways. *Nitric Oxide*. Volume 18, Issue 3, 2008,223–228
- 123) Youn JY, Park HY, Lee JW, Jung IO, Choi KH, Kim K, Cho KH. Evaluation of the immune response following exposure of mice to bisphenol A: induction of Th1 cytokine and prolactin by BPA exposure in the mouse spleen cells. *Arch Pharm Res*. 2002;25:946–953.
- 124) Zoeller RT, Bansal R, Parris C. 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*. 2005;146(2):607–612.