

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Bisfenol S: studium endokrinně-disrupčního efektu na reprodukci samců.**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Nikola Eretová**

**Obor studia: Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc.**

**Konzultant: Ing. Jan Nevoral, Ph.D.**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Bisfenol S: studium endokrinně-disrupčního efektu na reprodukci samců." jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4.2018

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Jaroslavu Petrovi, DrSc. za vedení mé diplomové práce, mému konzultantovi Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc při zpracování mé diplomové práce, za možnost uskutečnit experiment v laboratoři reprodukční medicíny v Biomedicínském centru v Plzni. Poděkovat bych také chtěla Mgr. Miriam Štiavnické za pomoc a podporu při zpracování experimentu.

# Bisfenol S: studium endokrinně-disrupčního efektu na reprodukci samců.

## Souhrn

Endokrinní disruptory (EDCs, Endocrine Disruptors Compounds) jsou chemické látky, které vstupují do organismu z prostředí různými cestami a ovlivňují jej prostřednictvím hormonálního řízení. EDCs jsou přítomné v prostředí a v produktech běžné potřeby. Mezi tyto chemické látky patří skupina bisfenolů. Významným zástupcem je bisfenol A (BPA), který se začal používat pro jeho výhodné chemické vlastnosti. Pro negativní účinek BPA, jednoho z dosud nejpoužívanějších, se začal používat bisfenol S (BPS). BPS byl zprvu považován za bezpečnější alternativu BPA, ale velký nárůst jeho produkce a skutečnost, že je analogem BPA, vedla ke zkoumání této látky.

Byla stanovena hypotéza, že BPS negativně ovlivňuje reprodukční kapacitu samců myši. Cílem práce bylo vyhodnotit reprodukční parametry samců myši po perorální expozici BPS. Samci myši byli exponováni *in vivo* koncentrací BPS po dobu osmi týdnů, rozdělení do 4 experimentálních skupin. V experimentu byly hodnoceny rozdíly mezi skupinami v živé hmotnosti, relativní hmotnosti varlat, motilitou spermií, akrozomální reakcí a fragmentací DNA. Expozice BPS v koncentraci  $1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$  (BPS2) ovlivnila hmotnost zvířat a relativní hmotnost varlat. Motilitu spermií ovlivnila expozice BPS v koncentraci  $0,001 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$  (BPS1). Naopak parametry jako relativní množství mrtvých spermií a index DNA fragmentace zůstaly expozicí BPS neovlivněné. Z výsledků, které ukazují snížené procento motilních spermií při expozici velice nízkým koncentracím BPS (BPS1) a snížení relativní hmotnosti varlat při vystavení koncentracím vyšším (BPS2 a BPS3), lze odvodit, že BPS působil na reprodukční kapacitu myši negativně.

Endokrinní disrupce BPS není ještě zdaleka prozkoumána, proto bude zapotřebí dalších experimentů zaměřených na mechanismus účinku BPS, jako například proteomické a genetické analýzy.

**Klíčová slova:** Endokrinní disruptory, bisfenol S, reprodukce, spermie

# **Bisphenol S: study of endocrine-disruptive effects on male reproduction.**

## **Summary**

Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) are chemical substances that enter the organism in different ways from the environment and affect it through hormonal control. EDCs are present in the environment and in products of everyday use. These chemicals include the group of bisphenols. A significant representative is bisphenol A (BPA) which was used due to its favourable chemical properties. Because of the negative effects of BPA, bisphenol S (BPS), one of the most used varieties, began to replace it. BPS was initially considered to be a safer alternative to BPA, however, a large increase of its production and the fact that it is a BPA analogue, has led to the research of this substance.

A hypothesis has been set that BPS negatively affects the reproductive capacity of male mice. The objective of the work was to evaluate the reproductive parameters of male mice after oral exposure to BPS. Male mice, divided into 4 experimental groups, were exposed *in vivo* to BPS concentration for the period of eight weeks. Differences between groups in live weight, relative weight of testicles, sperm motility, acrosomal reaction and DNA fragmentation were evaluated within the experiment. Exposure to BPS in concentration  $1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$  (BPS2) influenced the weight of animals and relative weight of testicles. Sperm motility was affected by exposure to BPS in concentration  $0.001 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$  (BPS1). On the contrary, parameters such as relative weight of dead sperm and DNA fragmentation index remained unaffected. It can be deduced from the results showing a reduced percentage of motile sperm at exposure to very low BPS (BPS1) concentrations and a decrease of the relative weight of testicles at exposure to higher concentrations (BPS2 and BPS3), that BPS had a negative effect on the reproductive capacity of the mice.

Endocrine disruption of BPS is far from being explored, therefore further experiments will be needed, using *e.g.* proteomic and genetic analyses with focus on the mechanism of the effect of bisphenol S.

**Keywords:** Endocrine disruptors, bisphenol S, reproduction, sperm

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Samčí reprodukce.....</b>	<b>3</b>
3.1.1	Anatomie.....	3
3.1.2	Spermatogeneze .....	4
<b>3.2</b>	<b>Negativní vlivy na samčí reprodukci .....</b>	<b>5</b>
<b>3.3</b>	<b>Endokrinní disruptory .....</b>	<b>5</b>
3.3.1	Definice.....	5
3.3.2	Historie a výskyt endokrinních disruptorů.....	6
3.3.3	Mechanismus působení endokrinních disruptorů .....	8
3.3.4	Vliv EDCs na samčí reprodukci .....	9
<b>3.4</b>	<b>Bisfenol A .....</b>	<b>10</b>
3.4.1	Historie.....	10
3.4.2	Vlastnosti a chemická struktura .....	10
3.4.3	Výskyt.....	10
3.4.4	Toxicita a vliv na zdraví .....	11
3.4.5	Vliv BPA na reprodukci .....	12
<b>3.5</b>	<b>Bisfenol S.....</b>	<b>15</b>
3.5.1	Historie.....	15
3.5.2	Vlastosti a chemická struktura .....	15
3.5.3	Výskyt.....	16
3.5.4	Toxicita a vliv na zdraví .....	17
3.5.5	Vliv BPS na reprodukci samců.....	19
<b>4</b>	<b>Materiál a metodika.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>Zvířata .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2</b>	<b>Sběr vzorků.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3</b>	<b>Zpracování myších spermíí .....</b>	<b>23</b>
<b>4.4</b>	<b>Průtoková cytometrie.....</b>	<b>23</b>
4.4.1	PNA/PI.....	23
4.4.2	SCSA .....	24
<b>4.5</b>	<b>Statistické hodnocení .....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>Design experimentu .....</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>27</b>

<b>6.1</b>	<b>Hmotnost myši.....</b>	<b>27</b>
<b>6.2</b>	<b>Poměr hmotnosti varlat a hmotnosti těla.....</b>	<b>28</b>
<b>6.3</b>	<b>Motilita spermií .....</b>	<b>29</b>
<b>6.4</b>	<b>Průtoková cytometrie.....</b>	<b>30</b>
6.4.1	Analýza integrity akrozómu a viability spermií .....	30
6.4.2	Analýza integrity DNA prostřednictvím SCSA.....	32
<b>7</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>37</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>38</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>54</b>
<b>11</b>	<b>Seznam příloh.....</b>	<b>55</b>

# 1 Úvod

BPS je chemická látka řadící se mezi EDCs. EDCs narušují rovnováhu organismu prostřednictvím hormonálního systému. Organismy jsou těmito látkám vystaveny z prostředí a také z mnohých produktů, jako jsou například obalové materiály nápojů a jídel. Tyto látky dokáží fyziologické hormony napodobovat, ale dokáží hormonální rovnováhu narušovat i dalšími způsoby. BPS se začal používat především jako bezpečnější alternativa BPA. BPA byl součástí mnohých studií, které postupně ukazovaly, že BPA může způsobovat některé z chorob zvířat i lidské populace. Pro potvrzenou toxicitu BPA bylo jeho používání omezeno. Expanze používání BPS začala po roce 2000, kdy se začal používat především jako komponenta plastů, pro jeho vlastnosti, kterými jsou termostabilita a fotostabilita. Produkce BPS výrazně stoupla omezením používání BPA. BPS se vyskytuje ve značném množství v účtenkách a bankovkách, nápojových kartonech, plechovkách a dalších produktech běžné potřeby. Koncentrace BPS se nacházejí také ve vodách a půdě. Protože je BPS analogem BPA, začaly přibývat studie testující dopad BPS na různé oblasti zdraví organismu, včetně reprodukčních schopností. Předložená práce je zaměřená na účinek *in vivo* expozice myších samců na jejich reprodukční schopnosti, vyjádřené kvalitou spermií. Použitý model simuluje perorální expozici mužské lidské populace velmi nízkými dávkami BPS v období reprodukčního věku.



## **2 Cíl práce**

Cílem práce je ověřit hypotézu, že bisfenol S negativně ovlivňuje reprodukční kapacitu samců myši.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Samčí reprodukce

#### 3.1.1 Anatomie

Tvorba samčí reprodukční soustavy začíná již v prenatalním období jedince, tedy vývojem pohlavních orgánů plodu během intrauterinního vývoje. Pohlavní žlázy mají mezenchymální základ a jejich vznik spočívá v migraci primordiálních zárodečných buněk ze stěny žloutkového vaku, kaudální části prvostřeva a následovné osidlování gonadální lišty.

Úplný počátek gonád je v indiferentním stádiu, ve kterém nacházíme močopohlavní lištu, v níž je mediálně uložena lišta genitální. Genitální lišta postupem času vytváří val, kde se usidlují primární zárodečné provazce, které obsahují primordiální zárodečné buňky. V tuto chvíli se gonáda skládá z kůry a dřene, u zárodků se samčím genotypem (XY) kůra zaniká a dřeň se diferencuje ve varle.

V dospělém věku jednice varlata slouží k tvorbě spermií, které se tvoří v semenotvorných kanálcích, ty tvoří největší procento zastoupení varletního parenchymu. Varlata jsou obalena vazivovým obalem, jež zároveň rozděluje varlata septy. Ve varleti najdeme různá vývojová stadia spermií a další dva, velice důležité, typy buněk. Těmi jsou Sertoliho buňky, které mají funkci podpůrnou a výživnou a buňky Leydigovy (buňky intersticiální) produkující testosteron. Výběžky Sertoliho buněk zajišťují těsný kontakt mezi všemi vývojovými stadii spermií a rozdělují semenotvorné kanálky na vnější bazální část a vnitřní část.

Na varle funkčně navazuje nadvarle, v němž se shromažďují spermie. Nadvarle je tvořeno odvodnými kanálky z varlete, které následně vyústí do vývodu nadvarlete. Anatomicky se nadvarle skládá z hlavy, těla a ocasu. Do hlavy nadvarlete jsou přiváděny spermie z varlete, zde dozrají a získají schopnost pohybu.

Pokračováním vývodného systému ocasu nadvarlete je chámovod. Při opuštění nadvarlete pokračuje do dutiny břišní, kde se sbíhá s varletní tepnou, žílou, nervem, lymfatickými cévami a s vnitřním zdvihačem varlete do semenného provazce, který je obalen útrobním listem poševního obalu.

Vlastním kopulačním orgánem samců je pyj. Tento orgán slouží k vpravení spermatu do samičího reprodukčního systému. Volnou část pyje chrání vchlípená kožní duplikatura, předkožka (Shrnuto v Kittnar et al., 2011).

### 3.1.2 Spermatogeneze

Spermatogeneze je celá proměna zárodečných epitelových buněk (kmenových buněk) na spermie. Během tohoto procesu dochází k dělení buněk dvojího typu, mitóza a meióza. Meiotickým dělením je zajištěno, aby finální spermie měla haploidní počet chromozomů.

V první fázi meiotického dělení si vytváří každý chromozom z páru dvě chromatidy, které jsou spojené, což znamená, že tyto chromozomy mají zdvojené geny. Následně dochází k rozdělení primárního spermatocyty na dva spermatocyty sekundární, přičež každý sekundární spermatocyt má jeden chromozom, který je tvořen spojením dvou chromatid. V profázi prvního meiotického dělení dochází k důležité rekombinaci chromozomů, takzvanému crossing overu, kdy dochází k překřížení chromatid a výměně úseků mezi nesesterskými chromatidami. Druhé meiotické dělení zajišťuje vznik dvou spermatid, a to z každého sekundárního spermatocyty. Při tomto dělení se od sebe chromatidy oddělí a vytvoří se tak dva soubory duplicitních genů. Každá spermatida má tedy jen jednu sadu chromozomů.

Spermatogonie jsou umístěny v bazální části semenotvorných kanálků. Ze spermatogonií během první mitózy vzniknou dvě buňky, jedna stejná jako buňka původní, která zůstává na původním místě a druhá, spermatogonie typu A, která migruje bariérou Sertoliho buněk do vrstvy buněk blízko dutiny semenotvorného kanálku. V němž se spermatogonie typu A mitoticky rozdělí a vzniká velké množství spermatogonií typu B, ty se znovu dělí mitózou a vznikají primární spermatocyty s dvojnásobným počtem chromozomů. Další dělení je již meiotické, vznikají sekundární spermatocyty a po dalším meiotickém dělení spermatidy s haploidním počtem chromozomů. Spermidy následně dozrávají téměř v lumen kanálku a následně jsou jako zralé spermie do lumen uvolňovány.

Spermatogeneze probíhá ve vlnách, které slouží k zajištění kontinuální produkci spermií. Pro správný průběh spermatogeneze je důležité hormonální řízení. Řízení vychází primárně z hypofýzy, kdy luteinizační hormon (LH) reguluje produkci testosteronu Leydigovými buňkami. LH z hypofýzy a testosteron z varlat na sebe působí systémem negativní zpětné vazby. Aby testosteron mohl ovlivnit spermatogenezi, musí difundovat z intersticiální tkáně do semenotvorných kanálků. Testosteron podporuje meiotické dělení, a tak především ovlivňuje spermatogenezi. Z hypofýzy přichází do varlat také folikulostimulační hormon (FSH), ten stimuluje produkci proteinu vázajícího androgeny (ABP=androgene binding protein), který je produkován Sertoliho buňkami. Tento protein váže testosteron i jiné androgeny a zajišťuje tak jejich správnou koncentraci potřebnou k spermatogenezi. Sertoliho buňky mají také schopnost produkovat inhibin, který tlumí sekreci FSH (Shrnuto v Kittnar et al., 2011).

## **3.2 Negativní vlivy na samčí reprodukci**

Na samčí reprodukci má vliv mnoho faktorů vnějšího prostředí. Vlivy na samčí reprodukci mohou být pozitivní i negativní. Primárním vlivem na samčí reprodukci je samotný genotyp. Dále to je vliv matky na vyvíjející se plod v prenatálním období (tzv. maternální faktor). Po narození jedince potom vliv vnějšího prostředí, ať je to životní styl, nebo škodlivé chemické látky vyskytující se v prostředí. Zřejmě z tohoto důvodu se v posledních letech stále zvyšuje výskyt poruch v reprodukci samců, nejčastěji se jedná o zhoršenou kvalitu spermatu, výskyt rakoviny varlat a vývojové vady, jako je kryptorchismus hypoplazie varlat, malformace močové trubice a šourku. Časný fetální vývoj je nejvíce kritické období, kdy se zakládá endokrinní systém a vyvíjejí se orgány (Givercman et al., 2011).

Environmentální vlivy mohou také způsobit poškození exprese důležitých genů, což může způsobit vznik nějaké z chorob samčího pohlavního ústrojí. Příkladem takového vlivu je snížení počtu spermií u mužů o 20 %, a to vlivem polychlorovaných bifenylnů prostřednictvím opakování CAG sekvencí v AR genu (Givercman et al., 2007).

Mezi chemické látky ovlivňující samčí reprodukci patří EDCs, které mají vliv na reprodukci prostřednictvím endokrinního systému, kdy mohou hormony napodobovat nebo měnit jejich aktivitu (Caserta et al., 2008). Působením endokrinních disruptorů může docházet ke snížení produkce testosteronu, což způsobí horší kvalitu ejakulátu samců (Givercman et al., 2011).

## **3.3 Endokrinní disruptory**

### **3.3.1 Definice**

EDCs jsou látky vstupující do organismu z vnějšího prostředí, které mají schopnost narušovat rovnováhu fyziologických funkcí organismu na úrovni hormonálního řízení. EDCs mají schopnost napodobovat či umocňovat působení tělem produkovaných hormonů, ovlivňují endokrinní systém na základě regulace produkce, uvolňování, transportu, metabolismu a receptorové interakce endogenních hormonů (Colborn, 2004). Mezi EDCs se řadí v první řadě syntetické chemikálie používající se jako pesticidy a herbicidy (např. DDT), tepelné stabilizátory a chemické katalyzátory (např. TBT, tributylin), kontaminanty plastů (bisfenoly), léčiva (DES, diethylstilbestrol; EE2, 17 alfa – ethynilestradiol) a druhou skupinou jsou EDCs

přírodního původu, jako jsou například fytoestrogeny, které nacházíme v přirozené potravě zvířat i lidí (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Společnou vlastností pro EDCs je nelineární efekt (též nemonotónní efekt), což znamená, že vyšší dávky těchto látek nemusí vždy způsobovat zhoršení. Často vykazují nižší dávky EDCs silnější efekt než dávky vysoké. Další vlastnost, se kterou se EDCs spojují, jsou velice nízké koncentrace působení. Toto působení se označuje jako subtoxické, což znamená, že viabilita buněk není ovlivněna, avšak jejich fyziologické funkce a metabolismus ano (Vandenberg, 2014).

### **3.3.2 Historie a výskyt endokrinních disruptorů**

Termín endokrinní disruptory se vyskytuje od roku 1991, kdy skupina amerických vědců na základě výzkumu chemikálií dokázala, že mnoho chemických sloučenin dokáže pronikat do životního prostředí prostřednictvím lidské činnosti a následně mají nepříznivý vliv nejen na samotné prostředí, ale také na zdraví živočichů a lidí v něm žijících (Colborn and Clement, 1992). Po vstupu do organismu mají schopnost narušovat správnou funkci endokrinního systému. Od doby, kdy byly dokázány negativní účinky těchto látek, probíhají stále další studie vlivu expozice EDCs na bezobratlé, ryby, domestikovaná zvířata a člověka (Hotchkiss et al., 2008). EDCs ale nemusí být pouze syntetického původu, existují i přírodní látky s endokrinní aktivitou, to jsou například fytoestrogeny (EFSA, 2010). Výsledkem negativního působení endokrinních disruptorů na organismy je řada civilizačních chorob, například rakovinné bujení, poruchy metabolismu, omezené funkce různých orgánů a v neposlední řadě EDCs negativně působí na reprodukční funkce živočichů (Gore, 2007).

EDCs je možné najít v celé řadě produktů, se kterými se setkáváme denně v běžném životě, mezi tyto produkty patří například plastové lahve, plechové nádoby, nejrůznější čisticí prostředky, dětské hračky, kosmetika, pesticidy a podobně. EDCs je možné nalézt také v potravinách, do kterých vstupují především prostřednictvím obalů, v nichž jsou potraviny a nápoje baleny. Organismus je vystaven účinkům EDCs různými způsoby, nejčastěji prostřednictvím potravin a nápojů, medikamentů, při aplikaci pesticidů na plodiny a používáním kosmetických přípravků. EDCs vstupují do organismu různými cestami, mezi které patří vstup prostřednictvím kůže, vzduchu, vlasů nebo přijímanou potravou. EDCs se od sebe liší několika vlastnostmi, jednou z nich je doba perzistence, tedy doba, po kterou látky zůstávají v prostředí, například některé EDCs, které se používají ve výrobě elektrických zařízení, jsou vysoce perzistentní a pomalu se odbourávají, proto jsou potenciální hrozbou na delší dobu

(NIEHS, 2010). Další takovou vlastností EDCs je míra jejich průniku, která se zvyšuje při vystavení vysokým teplotám nebo neobvyklým hodnotám pH, kdy se zvýší množství prostoupení látky z obalu nádoby, do jeho obsahu (tekutiny, potraviny) (Malaingaiyah et al., 2012). EDCs nabývají v organismu různého mechanismu účinku. V dnešní době působí na populaci EDCs v kombinacích více různých látek, které mohou mít společně horší dopad na organismus než jedna látka samostatně (Jacobs et al., 2017).

EDCs se obecně vyznačují také vysokou genotoxicitou, díky čemuž mohou působit změny prostřednictvím poškození DNA (Hagger et al., 2006). Například BPA působí genotoxicky na organismy tak, že při oxidativním metabolismu vzniká z BPA BPAQ (Bisphenol A-3,4-quinone), který může reagovat s DNA a být tak důvodem genotoxicity BPA (Kolšek et al., 2012, 2013).

EDCs ohrožují voně žijící živočichy, protože jsou jimi kontaminovány vody i potrava, kterou živočichové přijímají (Cunha et al., 1992). Příkladem fenotypu ovlivňovaného EDCs ve volné přírodě je populace amerických aligátorů (*Alligator mississippiensis*), kteří žijí v jezerech kontaminovaných EDCs. U populací aligátorů žijících v různých kontaminovaných jezerech se odlišují metylované oblasti DNA v porovnání s populací aligátorů v jezeře nekontaminovaném. Tato epigenetická změna by mohla působit dopad na další generace populace aligátorů v environmentálně znečištěných jezerech (Guillette et al., 2016). Nebezpečí hrozí při dlouhodobém vystavení od brzkých vývojových stádií, kdy mohou být postiženy samotné organismy EDCs vystavení, nebo mohou vznikat chyby při vývoji jejich potomků, které se mohou projevit až v jejich dospělosti. Pro normální vývoj obratlovců je nutná komunikace mezi buňkami. Hlavní roli při vývoji hrají steroidní hormony produkované vaječníky, nadledvinami a placentou matky (Cunha et al., 1992). Je dokázáno, že vystavení plodu EDCs, může poškodit diferenciaci orgánů, protože mění normální hormonální regulaci vývoje plodu. Nejvíce jsou ohroženy orgány, které mají receptory pro pohlavní hormony, jsou to pohlavní orgány u obou pohlaví, ale také mozek plodu, ledviny a štítná žláza (Petersen et al., 1993).

Toto nebezpečí se týká zejména také lidské populace. Je dokázáno, že díky výskytu vysokých koncentrací EDCs ve vodách jsou ovlivňováni potomci žen, které v průběhu těhotenství nebo během kojení přijímají ryby. Děti těchto matek jsou prostřednictvím dělohy nebo mléka vystavení EDCs, což může pro děti znamenat v pozdějším věku poruchy krátkodobé paměti a poruchy pozornosti (Jacobson et al., 1990). Některé poruchy způsobené vystavením EDCs se projeví okamžitě po narození jedince, ovšem jiné poruchy se projeví až v pozdějším životě. Především potom reprodukční poruchy se projevují až po dosažení puberty jedince (Colborn et al., 1993). Zvláště lidská populace je ohrožena efektem negenomickým,

genomickým a epigenetickým. Negenomický efekt EDCs může působit na signální molekuly, enzymy, a tím měnit buněčný signalling. Genomický efekt se spojuje s receptory vázajícími hormony a receptory pro růstové faktory, což může působit změny genové exprese. Epigenetický efekt působí změny na DNA, RNA a histonech, následkem může být pozměněný metylační vzor DNA, změny mikro RNA a modifikace histonů (Žalmanová et al., 2016).

Pro pochopení problematiky expozice EDCs je důležité znát mechanismus jejich fungování v organismu. Existuje několik principů, na kterých mechanismy působení EDCs pracují.

### **3.3.3 Mechanismus působení endokrinních disruptorů**

EDCs především působí na organismus tak, že imitují, nebo částečně napodobují přirozené hormony působící v těle. Mezi takto ovlivňované hormony patří především hormony pohlavní, estrogeny a androgeny nebo také hormony štítné žlázy. Imitace hormonů je nejlépe známá a prozkoumaná vlastnost EDCs. Tento mechanismus je založen na tom, že chemická látka imitující hormon, se navazuje na specifické hormonální receptory, a tím spouští v buňce akci, jež odpovídá té, kterou spouští fyziologický hormon. Mezi specifické hormonální receptory patří aryl hydrokarbonové (AhR), estrogenové, androgenové a progestinové receptory (Cheek et al., 1999). Je dokázáno, že endokrinní disruptor a imitovaný hormon nemusí mít vůbec podobnou chemickou strukturu. Tento mechanismus tedy může mít za následek nadměrnou produkci pohlavních hormonů. U různých živočišných taxonů, se účinek EDCs, vzhledem k evolučnímu stáří endokrinního systému, zpravidla neliší. EDCs mají dále schopnost z fyziologických hormonů vytvářet hormony antagonistické, anti-estrogeny a anti-androgeny, tak že zablokují receptor uvnitř buňky a fyziologický hormon se nemůže navázat a projevit se (Sumpter a Jobling, 1995).

Chemické látky působící jako EDCs, nemusí souviset pouze s receptory buněk reagujícími na hormony, ale mnoho disruptčních látek může narušovat syntézu, skladování, sekreci, transport a rozklad hormonů (Kavlock et al., 1996). Skrze tyto vlastnosti mají EDCs dalekosáhlý vliv na celý organismus (Caserta et al., 2008).

Vystavení organismu EDCs v kritických obdobích vývoje, kdy je velice citlivý, může způsobit účinky trvalého rázu, které mohou být následně přenášeny do dalších generací (Jacobs et al., 2017). Podstatné změny působené EDCs jsou změny epigenetické, což znamená změnu genové exprese, která přetrvává i po vymizení působení EDCs, epigenetické změny nezahrnují změnu genové sekvence nebo struktury (McGovan and Szyf, 2010).

Epigenetické změny se mohou týkat modifikaci histonů a metylace DNA a vznik nekodujících RNA (Kornberg and Lorch, 1999). Epigenetickými změnami indukovanými EDCs je ohrožena nejen lidská populace, která je vystavena velkému množství různých EDCs ve všech fázích ontogeneze (Marczylo et al., 2016). Methylace DNA v imprintovaných oblastech způsobené vystavením EDCs se spojují s abnormalitami spermií a vývoje oocytů, ukázalo se, že těmito změnami je více narušen paternální imprinting, než maternální (Jacobs et al., 2017).

### **3.3.4 Vliv EDCs na samčí reprodukci**

O samčí reprodukci se uvádí, že její abnormality v průběhu let stále přibývají (Toppari et al., 1996).

První hypotéza o tom, že EDCs s estrogení aktivitu jsou zodpovědné za poruchy samčí reprodukce, byla stanovena v roce 1993 (Shrape and Skakkebaek, 1993). Endokrinně disruptivní efekt se mnohdy projevuje stimulačním účinkem.

V poslední době se výrazně snižuje počet spermií u mužů a zvyšuje se výskyt rakoviny varlete, hypospadiu a kryptorchismu. V počátku výzkumu mužské fertility nebylo zjevné, čemu její klesající tendenci přisuzovat (Carlsen et al., 1992). V posledních několika letech jsou tyto jevy připisovány především působení EDCs v raném období vývoje. Studie sledující muže, vystavené EDCs, ukazují, že vystavení v prenatálním i postnatálním období zvyšuje výskyt morfologicky abnormálních spermií a snižuje schopnost spermií kapacitovat a následně penetrovat oocyt (Hsu et al., 2003). Výzkumy pracující s lidmi ukazují, že vystavení různým EDCs negativně ovlivňují samčí reprodukci, ať už jde o počet spermií, koncentraci v ejakulátu, motilitu nebo poškození spermatické DNA (Giwerzman et al., 2007).

Působení EDCs, konkrétně dioxinů, během prenatálního vývoje nepříznivě ovlivňuje morfologii spermií, produkci spermií a celkově plodnost samečů myši a potkanů (Smits-van Prooije et al., 1996; Faqi et al., 1998; Huang et al., 1998). Při vystavení polychlorovaným bifenylym a dibenzofuranům bylo dokázáno snížení motility spermií potkanů a jejich schopnost penetrovat vajíčko (Hsu et al., 2003).

První publikovanou problematikou byla zhoršující se kvalita spermií (Carlsen et al., 1992). Jako další byl velice často studován počet spermií, kdy byl ve většině případů dokázán pokles (Handelsman, 2001). Následovaly však výzkumy, které dokonce prokázaly zvýšený počet spermií po expozici EDCs (Cocuzza and Esteves, 2014).

Mezi EDCs působící na samčí reprodukci patří skupina látek zvané bisfenoly.



## **3.4 Bisfenol A**

### **3.4.1 Historie**

BPA byl poprvé syntetizován v roce 1891 ruským chemikem Alexandrem Dianiem. Estrogenní aktivita BPA byla objevena v roce 1936 (Dodds and Lawson, 1936). BPA je jedna z prvních sloučenin, u kterých byla zjištěna estrogenní aktivita. V roce 1950 se přišlo na to, že BPA získá polymerizací užitečné vlastnosti, které vytvářejí levné polykarbonáty, které jsou lehké, bezbarvé, snadno barvitelné, mechanicky odolné, termostabilní, odolné vůči chemikáliím, nemění se v čase a jednoduše se tvarují vlivem vyšší teploty. Pro jeho vlastnosti se rychle stal jednou ze sloučenin s nejvyšší produkcí (Eladak et al., 2015).

### **3.4.2 Vlastnosti a chemická struktura**

BPA, chemicky 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan, vznikl kondenzací fenolu s acetonem (Eladak et al., 2015).

BPA se vyznačuje silným nelineárním efektem (Vandenberg, 2014).

Míra uvolňování BPA z plastu nebo jiného materiálu se zvyšuje se vzrůstající teplotou nebo při vystavení kyselému či zásaditému roztoku (Malaingaiyah et al., 2012).

BPA řadíme mezi látky xenoestrogenní, to znamená, že vykazuje estrogenní aktivitu, která má u BPA široký dopad na organismy (Maffini et al., 2006).

### **3.4.3 Výskyt**

BPA je průmyslová chemická látka, která se využívá ve velkém množství především ve výrobě běžných umělých hmot, které jsou v dnešní době prakticky všudypřítomné (Machtinger and Orvieto, 2014). BPA se používá při výrobě plastů z polykarbonátů (PC), epoxidových pryskyřic a jiných polymerů. Plasty z PC se používají pro výrobu hraček, dětských dudlíků nebo obalových materiálů potravin či nápojů. Epoxidové pryskyřice se používají při výrobě povlaků plechovek a nátěrů používajících se na nádrže na pitnou vodu. BPA dále můžeme najít v zubních tmelech, nátěrových barvách, tiskařských barvách a zpomalovačích hoření (EFSA, 2018). Jelikož je BPA součástí mnoha výrobků, se kterými se lidský organismus běžně setkává, a navíc je to velice nestabilní sloučenina, není složité, aby byl organismus této látce vystaven. Z výrobků, ve kterých se BPA vyskytuje, se uvolňuje do prostředí. Koncentrace BPA byly zjištěny v ovzduší, řekách, pitné vodě i potravinách. Do potravin, kterými se BPA dostává

do organismu, se látka dostává uvolněním z obalů, ve kterých jsou potraviny baleny (plastové nádoby, konzervy...) (Arnika, 2014).

#### **3.4.4 Toxicita a vliv na zdraví**

V závislosti na vysokém výskytu BPA v prostředí byly prováděny studie, které dokázaly, že vystavení BPA může způsobovat mnoho chorob u lidí i zvířat (Huang et al., 2012). Nemoci u lidí, se kterými je BPA spojován, je například diabetes, obezita, onemocnění kardiovaskulárního systému, chronická onemocnění dýchacího ústrojí, onemocnění ledvin, rakovina prsu, odchylky od normálního chování, poruchy vývoje zubů a nedostatky v reprodukci u obojího pohlaví (Vandenberg et al., 2012).

Po těchto zjištěních se začalo uvažovat o omezení používání BPA. Věci se začal zabývat evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA; European Food Safety Authority). EFSA má za úkol zpracovávat nezávislá vědecká stanoviska pro všechny oblasti, které se týkají bezpečnosti potravin nebo krmiv. Tento úřad také monitoruje a analyzuje kontaminující chemické látky a posuzuje rizika. Touto činností má především přispívat k ochraně lidského zdraví, zdraví zvířat a rostlin a chránit životní prostředí. V roce 2006 dokončil úřad EFSA první vyhodnocení rizik vystavení BPA a stanovila tolerovatelný denní příjem (TDI, Tolerable Daily Intake) 0,05 mg/kg/den. V roce 2008 EFSA hodnotí další studie, které značí korelaci mezi expozicí BPA a chronickými chorobami, což vypovídá o dlouhodobém vystavení populace BPA. Zároveň úřad také zjišťuje, že dospělí i děti dokáží rychle metabolizovat a eliminovat BPA i ve větších koncentracích, než je TDI. V roce 2010 EFSA obdržela žádost komise, aby byly vzaty v potaz nové vědecké poznatky, které by mohly změnit dřívější závěry o BPA. Úřad se v roce 2012 začal zabývat problematikou rizik vystavení nízkým koncentracím BPA. Na základě toho došlo k přehodnocení rizik vystavení člověka BPA ve stravě a přihlédnuto bylo i k dalším možným cestám expozice. Další rok EFSA v návrhu vědeckého stanoviska o BPA říká, že hlavní cestou expozice jsou potraviny a přijímané koncentrace člověkem jsou nižší, než úřad odhadoval. Poté v roce 2015 již byla zcela posouzena expozice a toxicita BPA a závěrem bylo, že při současné expozici nepředstavuje BPA žádné zdravotní riziko u žádné věkové skupiny. V roce 2017 EFSA přistupuje k novému vyhodnocení toxicity BPA, který má předem určený protokol (EFSA, 2018). Během těchto let došlo také k legislativnímu omezení používání BPA v Evropě. V roce 2011 přijala Evropská komise směrnici, která zakazuje používání BPA ve výrobě polykarbonátových kojeneckých lahví (Eur-Lex, 2011). To je jediné legislativní

omezení pro používání BPA platné pro celou Evropskou Unii. Stejné legislativní opatření bylo zavedeno také v Americe a Číně (Liao and Kannan, 2014).

### 3.4.5 Vliv BPA na reprodukci

V souvislosti s negativním vlivem BPA na reprodukční zdraví organismů, bylo prováděno nespočet studií, které negativní dopad pouze potvrzovaly. Změny se při vystavení BPA objevovaly jak v samčích, tak i v samičích reprodukci. Za příčinu se často považuje estrogenní aktivita BPA. Změny v reprodukčních funkcích se objevovaly již ve fázi sexuálního chování, tyto změny byly způsobeny narušením fyziologické hladiny pohlavních hormonů, které jsou zodpovědné za správný vývoj pohlavních žláz a jejich následnou funkčnost, to celé je zodpovědné za správné projevy sexuálního chování, prostřednictvím něž je zajištěno prosazení jedince v reprodukci (Zala and Penn, 2004).

Vystavením BPA je ohrožena samičí reprodukce, při níž se objevuje negativní dopad na oogenezi, kdy efekt vystavení BPA například souvisí s porušením dělicího vřeténka a nesprávnou segregací chromozomů ve zrajícím oocytu (Hunt et al., 2003), problémy s nástupem oocytu do M fáze buněčného cyklu (Peretz et al., 2014) a následně předčasný rozchod chromatid (Pacchierotti et al., 2008). Při vystavení BPA dochází k výraznému poklesu růstu folikulů a zvýšení výskytu jejich zániku (Peretz et al., 2012).

Vlivem vystavení BPA dochází ke snížení počtu implantací (Berger et al., 2007) a při vystavení v prvních dnech březosti dochází ke snížení početnosti vrhů myši (Berger et al., 2008). Vystavení nízkým dávkám BPA během březosti myši má vliv na celkový počet narozených mláďat (Cabaton et al., 2011). Podávání BPA v poslední fázi meiozy a v začátcích vývoje embrya může způsobit chyby v expresi genu, což později vede k postižení plodu, špatnému rozvoji placenty a narušení postnatálního vývoje jedince (Susiarjo et al., 2013). Negativní vliv má BPA i na gonády a gamety (Newbold et al., 2009).

U samců dochází vlivem BPA k výskytu vývojových anomálií na urogenitálním traktu, zmenšení nadvarlat, zvětšení prostaty, snížení objemu ejakulátu, ve kterém byl i nižší počet spermií. K těmto změnám docházelo prostřednictvím změny hladiny hormonů (Wright et al., 2014). Například studie vystavující samce myši v pubertě BPA po dobu sedmi dní dokazuje, že počet spermií v nadvarlatech se snížil u skupiny BPA v porovnání se skupinou kontrolní o 20 %. Ve stejné studii se uskutečnila i analýza morfologie spermií, která ukázala především abnormality hlavičky, objevovaly se i malformace bičků spermií, ale byly méně časté. Abnormality spermií v BPA skupině se vyskytovaly asi o 10 % častěji než ve skupině

kontrolní. Studie ukazuje, že vystavení BPA v pubertě, má vliv na kvalitu spermií v dospělosti (Li et al., 2015). Vystavení BPA se spojuje s poškozením genetické informace ve spermiu, ale i se změnami epigenomu u potomstva (Wright et al., 2014). Dále byla u samčích ptačích embryí pozorována feminizace, která se projevovala přeměnou tkáně levého varlete na tkáň vaječníku, u samičích embryí dochází k malformacím Mülerových vývodů, dochází také k perzistenci Mülerových vývodů u samčích plodů (Stol et al., 1993).

Vystavení BPA má také dopad na vývoj a funkci varlat (Toyama and Yusama, 2003) a stejně tak i na vaječníky, kdy účinky, v tomto případě, závisí na koncentraci BPA (Peretz et al., 2014). Změny v histologii varlat byly zjištěny ve studii, která exponovala samce myši účinkům BPA po dobu 7 dní během puberty. Změny se objevily v uspořádání semenotvorných kanálků, kdy normálně jsou pevně uspořádány u bazální membrány, avšak ve skupině BPA bylo mnoho semenotvorných kanálků, u nichž se spermatogenetické buňky oddělovaly od membrány. Abnormality semenotvorných kanálků se objevovaly u BPA skupiny výrazně více (Li et al., 2015). Další studie, která také ukazuje abnormality v histologii, ukázala, že jsou redukovány vrstvy spermatogenních buněk a narušena jsou také pole těchto buněk (Wang et al., 2010). V souvislosti s abnormalitami histologie varlat a snížením kvality spermatu se snižuje obecně plodnost, která byla u samců vystavených v pubertě BPA přibližně o 13 % nižší než ve skupině kontrolní (Li et al., 2015). Jiná studie se zaměřila na celkovou hmotnost myši a hmotnost jejich varlat. Hmotnost těla byla výrazně nižší u myši vystavených BPA. U hmotnosti varlat se ukázalo, že absolutní hmotnost varlat byla výrazně snížena u skupiny vystavené BPA během puberty. Nicméně, vystavení BPA během puberty mělo jen malý vliv na relativní hmotnost varlat (Wang et al., 2010).

Negativně je vystavením BPA také ovlivněna spermiogeneze, kde na rozdíl od předchozí studie nebyla zjištěna žádná korelace mezi koncentrací BPA a mírou abnormalit u spermií (Toyama and Yusana, 2003). Studie využívající techniku TUNEL sledovala efekt BPA na apoptózu zárodečných buněk. Počet apoptotických buněk byl výrazně vyšší ve varlatech myši vystavených vysokým koncentracím BPA v porovnání s kontrolní, apoptotické buňky byly objeveny hlavně ve fázi VII-VIII semenotvorných kanálků. Z těchto výsledků vyplývá, že vystavení BPA během puberty má vliv na apoptózu zárodečných buněk ve varlatech (Wang et al., 2010).

Jeden z dalších experimentů používajících jako biomodel myši se zabýval poškozením spermií samců, kteří byli vystaveni BPA v prenatálním období prostřednictvím matky, intrauterinně. Tato studie ukázala, že u samců, kteří byli v prenatálním období vystaveni BPA, mají nižší počet spermií než samci v kontrolní skupině, i když tento rozdíl nebyl statisticky

významný. U skupiny samců, která byla vystavena nejvyšší koncentraci BPA, se vyskytovaly morfologické anomálie spermií. U skupin s nejvyššími koncentracemi se také ukázala snížená motilita spermií. Ve všech skupinách samců vystavených BPA byla výrazně snížena oplozovací schopnost spermií *in vitro* (Vilela et al., 2013).

Byla zjištěna negativní odpověď organismu na již velice nízké koncentrace BPA. Důležité jsou také rozličné cesty expozice, pro lidskou populaci je nebezpečná především transdermální expozice, při styku s termálním papírem, který také obsahuje koncentrace BPA (WHO, 2009).

Po mnohých důkazech negativního dopadu BPA na organismy se začalo uvažovat o bezpečnější alternativě (Welshons et al., 2006).

## 3.5 Bisfenol S

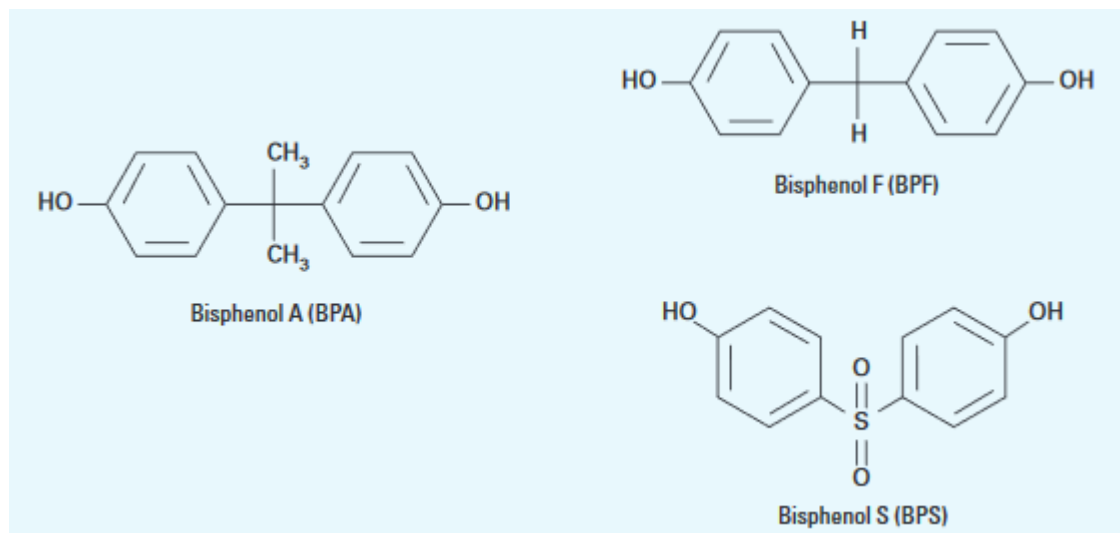
### 3.5.1 Historie

BPS byl poprvé syntetizován v roce 1869 jako barvivo, svoje využití ale našel především až po roce 2000 jako komponenta plastů (Glausiusz, 2014). Dnes můžeme přítomnost BPS očekávat ve všech produktech, ve kterých se dříve vyskytoval BPA, tedy v takzvaných „BPA free“ produktech (Mathew et al., 2014). Jako náhrada BPA se BPS začal používat už v roce 2012 (Liao et al., 2012c).

### 3.5.2 Vlastosti a chemická struktura

BPS (bis(4-hydroxyphenyl)sulfon) je složený ze dvou fenolových jader, která jsou dohromady spojena sulfonylovou skupinou. BPS je v současnosti široce používán místo BPA v „BPA free“ produktech, je považován za bezpečnější alternativu BPA (Chen et al., 2002). BPS se vyznačuje vyšší stabilitou než BPA a je také více odolný vůči vysokým teplotám a slunečnímu záření (Danzl et al., 2009).

Obrázek číslo 1 (příloha č.1) uvádí rozdíly v chemické struktuře BPA, BPS a BPF.



Obrázek č. 1: chemická struktura bisfenolu A, bisfenolu S a bisfenolu F (Rochester and Bolden, 2015).

BPS se ve výrobě začal ve velké míře používat pro svoje specifické vlastnosti. Těmi jsou, odolnost vůči vysokým teplotám (termostabilita), rezistenci vůči slunečnímu záření (fotostabilita) a údajně výrazně nižší estrogenní aktivitě. Hlavním důvodem využití BPS je však

náhražka škodlivého BPA (Kuruto-Niva et al., 2005; Chen et al., 2002). Ačkoliv se předpokládalo, že BPS bude bezpečnějším analogem BPA, bylo na základě studií dokázáno, že BPS dokáže interagovat s více jadernými receptory, z čehož lze předpokládat podobný negativní dopad na organismy, který je známý u BPA (Molina-Molina et al., 2013).

### 3.5.3 Výskyt

BPS se používá při výrobě epoxidových pryskyřic jako zpomalovač hoření, k čemuž se dříve používal BPA. BPS, díky svojí chemické struktuře, může zlepšit tepelné vlastnosti pryskyřic (Liang et al., 2017). BPS byl detekován v mnoha produktech, které každodenně používáme, jako jsou například zubní pasta, šampony, mýdla a make-up (Liao and Kannan, 2014). Mezi spotřební zboží, které obsahuje BPS, se řadí papírové produkty, hlavním zdrojem vystavení populace BPS je papír pro tepelný tisk, kde BPS slouží jako „vývojka“. S termo papírem se setkáváme především v podobě účtenek a papírových bankovek (Liao et al., 2012c), v tomto papíře se ukázal 100 % výskyt při studii, která byla provedena v Číně, Koreji, Japonsku a USA (Liao et al., 2012d). BPS také nacházíme v jídle (Liao and Kannan, 2013). BPS ale můžeme najít i v dalších různých produktech, stejně jako u BPA (nápojové kartony, plechovky apod.) (Vinas et al., 2010).

Koncentrace BPS se často vyskytují v pitné i užitkové vodě, vodách odpadních a koncentrace bisfenolů (BPA, BPS a BPF) byly zjištěny také v různých vodních útvech, kde je BPS zjišťován v sedimentujících částicích, což značí o kontaminaci v posledním desetiletí, kdy dochází k širokému používání BPS namísto BPA (Liao et al., 2012c). Průzkum asijských zemí v roce 2015 ukázal nejvyšší koncentrace BPS ve vzorcích z indických vod (Yamazaki et al., 2015). Další podobná studie ukázala výskyt BPS a jiných analogů BPA v sedimentu řek, které leží v blízkosti průmyslových oblastí v USA, Japonsku a Jižní Koreji (Liao et al., 2012c). BPS se obecně ukládá v sedimentech a půdách, stejně tak, jak je tomu u BPA (Wu et al., 2018). Bylo dokázáno, že BPS je více perzistentní v sedimentech než ve vodě a půdě (Chen et al., 2016).

Dále byl výskyt koncentrací BPS také dokázán v prachu uvnitř budov, což může být velice důležitým zdrojem expozice pro lidskou populaci, kdy se do organismu může dostat inhalační, transdermální cestou a ingescí (Xue et al., 2016, Liao et al., 2012b). BPS v prachu byl zjištěn nejen v průmyslových budovách, ale například také v rodinných domech, laboratořích, kancelářích a autech (Wang et al., 2015).

Díky používání BPS k výrobě plechovek a různých jiných obalových nádob, se také předpokládá výskyt BPS v potravinách, do nichž se BPS z obalů dostane během skladování, stejně jako je tomu u BPA. Výzkum v New Yorku dokázal frekvenci výskytu BPS ve 21 % potravin (Liao and Kannan, 2013). Ukazuje se, že vyšší nebezpečí výskytu koncentrací BPS je v potravinách, které jsou baleny v plechovkách, a to v porovnání se skleněnými, papírovými nebo plastovými obaly (Yang et al., 2014). Koncentrace BPS v potravinách není ale ovlivněna jen druhem obalového materiálu, ale také vlastnostmi potravin v nich balených, například frekvence výskytu koncentrací BPS v mase dosahují vysokého procenta (43%) (Liao and Kannan, 2014).

O rozsáhlém výskytu koncentrací BPS svědčí průzkum z roku 2012, který ukázal, že koncentraci BPS v moči má 81 % americké populace. Výzkum zároveň ukazuje, že koncentrace BPS v moči je srovnatelná s koncentracemi BPA (Liao et al., 2012a).

Produkce BPS rok od roku roste a tím, že nahrazuje BPA, přesahuje i jeho produkci (Molina-Molina et al., 2013). Rychlost nahrazování BPA BPS v produktech, není stejná ve všech zemích (Wu et al., 2018). Pro velkou míru používání BPS, která se stále navyšuje, roste taktéž počet studií zabývajících se toxicitou a vlivem BPS na organismy.

#### **3.5.4 Toxicita a vliv na zdraví**

Důležitou vlastností BPS, která ovlivňuje organismy, je estrogenní aktivita, za niž jsou odpovědné dvě hydroxylové skupiny BPS v para pozici, vzniklé isopropylací 4-hydroxy skupiny (Kuruto-Niwa et al., 2005). V *in vitro* studii byla zkoumána intenzita estrogenní aktivity BPS tak, že byla porovnána s aktivitou estradiolu (E2), výsledkem bylo, že BPS má stejný nebo dokonce silnější estrogenní potenciál než E2. Dokázána byla také antiandrogenní aktivita (Gringard et al., 2012; Molina-Molina et al., 2013; Rajasarkka et al., 2014; Rosenmai et al., 2014; Teng et al., 2013; Vinas and Watson, 2013) a androgenní aktivita (Kitamura et al., 2005). Při postnatálním vystavení BPS potkanů dochází k indukci růstu dělohy, což opět značí estrogenní potenciál BPS *in vivo* (Yamasaki et al., 2004). BPS především interaguje s membránovým receptorem pro estrogen ER $\alpha$ . Nízké koncentrace BPS mají vliv na signalizaci v buňkách, které jsou citlivé na estrogen (Barrett, 2013). V *in vitro* experimentech se ukázalo, že BPS ovlivňuje funkci H295R buněk, které produkují androgeny a indukují buněčnou toxicitu. BPS hraje roli v redukci syntézy steroidních hormonů a snižuje transkripci genů pro steroidogenezi (Feng et al., 2016).



Vystavení koncentracím BPS jsou spojeny s aktivováním proteinkináz, které jsou důležitými signálními molekulami pro buněčný růst, proliferaci a apoptózu. Dále se také vlivem BPS mohou aktivovat kaspázy 8 a 9, které se také podílejí na apoptóze buňky a uvolňování prolaktinu, který je důležitý pro spoustu biologických funkcí, včetně metabolismu (Barret, 2013).

Ve studii, kde zkoumali vliv BPS na buněčný signaling, zjišťovali efekt vystavení samotného BPS, ale také vystavení BPS v kombinaci s fyziologickým estrogenem (estradiolem, E2). V tomto experimentu byly také zkoumány účinky BPS na koncové prvky signálních drah MAPkinázy, na změnu počtu buněk a dále aktivaci nebo inhibici kaspáz, které se účastní těchto signálních drah v buňkách (Viñas and Watson, 2013). Výsledek byl takový, že k aktivování extracelulární kinázy (ERK), která se řadí do rodiny proteinkináz a je zodpovědná za průběh mnoha biologických dějů (proliferace, diferenciaci, buněčný pohyb, apoptóza...), v buňkách stačilo vystavení BPS po dobu pěti minut, tedy stejnou dobu jako u vystavení estradiolu (E2) (Viñas and Watson, 2013), tento výsledek odpovídal výsledkům předchozí studie (Jeng and Watson, 2011). Nejnižší koncentrace BPS způsobily vyšší odezvu ve formě signální molekuly proteinkinázy ERK než stejná koncentrace E2, odezva se snižovala současně se zvyšováním koncentrace BPS, což odpovídá nelineárnímu efektu, typickému pro EDCs (Vandenberg et al., 2012). V kombinaci BPS s E2 byla odezva ve formě ERK nižší, než tomu bylo u působení samotného BPS. Jako druhá signální molekula byla zkoumána kináza JNK, která patří mezi stresové kinázy, jež snižují apoptotický práh, zde byly výsledky rozdílné. Vystavení BPS nezpůsobilo aktivaci JNK, při působení BPS společně s E2 byla kináza JNK aktivována velice silně, více než při působení samotného E2 a znovu se potvrdil nelineární efekt, kdy nejnižší koncentrace vyvolaly největší odezvu (Viñas and Watson, 2013). Na proliferaci buněk měl stejný účinek BPS stejně jako E2, kde se také vyskytoval nelineární efekt. Kombinace obou látek působila na buňky inhibičně, kdy úbytek buněk byl způsoben apoptózou, kterou způsobila aktivace kaspázy 8 a 9, již aktivoval samotný BPS a kombinace BPS a E2, samotný E2 potlačil aktivitu kaspázy 9 (Viñas and Watson, 2013).

Jedna ze studií pracující s daniemi dále ukazuje, že vystavení BPS působí snížení hmotností pohlavních žláz, snižuje produkci vajíček a jejich schopnost „hatchovat“ je omezená nebo je čas „hatchingu“ prodloužen. Vystavení BPS může vést k embryonálním malformacím, snižování počtu spermií, snižování hladin testosteronu a může potlačovat expresi transkriptů genů pro produkci GnRH v hypotalamu (Ji et al., 2013; Naderi et al., 2014).

Další z mnoha problémů, který může být spojený s vystavením lidské populace BPS, je například obezita, která vzniká působením BPS na akumulaci lipidů a diferenciaci preadipocytů

(Boucher et al., 2016). Možným důkazem je korelace mezi dětskou obezitou a koncentracemi BPS a BPA v moči těchto dětí (Liao et al., 2012a; Xue et al., 2015).

Jednou z nejdůležitějších oblastí zdraví, jsou reprodukční schopnosti, které jsou stále více ovlivňované látkami z vnějšího prostředí, mezi které řadíme i BPS. BPS má významný negativní dopad na meiotické zrání prasečích oocytů, a to již při velice nízkých koncentracích (Žalmanová et al., 2017). BPS také prostřednictvím svojí estrogení aktivity zasahuje do vývoje samičího reprodukčního traktu, kdy se vyskytují změny jak na vaječnicích, tak i na děloze, změny se netýkaly jen abnormalit morfologie, ale také genové exprese (Hill et al., 2017).

### 3.5.5 Vliv BPS na reprodukci samců

Studie naznačují možnou toxicitu strukturálních analogů BPA jako je BPS, který se po legislativním omezení BPA, začal používat jako jeho analog (Rochester and Bolden, 2015). Data dokazující negativní vliv na zdraví savců, jsou velice omezená, existuje zatím jen několik studií, které se takovým efektem zabývaly a které ho dokazují (Ullah et al., 2016; Shi et al., 2017; Eladak et al., 2015)

Toxický vliv BPS na reprodukci například již dokázala studie používající jako biomodel háďátka obecné (*Caenorhabditis elegans*) (Chen et al., 2016). Studie na dáníích (*Danio rerio*) dokazují estrogení aktivitu BPS a také jeho toxicitu k organismům (Ji et al., 2013; Qiu et al., 2016).

Existující zjištění vlivu BPS na savcích ukazují, že vystavení BPS způsobuje oxidativní stres a působí anti androgenně stejně jako je tomu u BPA (Eladak et al., 2015; Ullah et al., 2016).

Experiment na krysích samcích ukazuje snížení koncentrací testosteronu v plasmě i koncentraci intratestikulárního testosteronu u skupin vystavených BPS v porovnání s kontrolní skupinou samců potkanů (Ullah et al., 2016).

Z další studie, která pracovala s HELN -hER $\alpha$  a -hER $\beta$  (linie HeLa buněk s expresí genů pro receptory ER $\alpha$  a ER $\beta$ ) buňkami, bylo vyvozeno, že schopnost BPS aktivovat estrogenové receptory alfa a beta je asi 5x až 10x nižší, než je tato schopnost u BPA, což znamená, že BPS vykazuje slabší estrogení aktivitu než BPA (Molina-Molina et al., 2013).

S efektem BPS na hladinu hormonů se spojuje efekt na reprodukční chování samců myší. Samci vystaveni BPS potřebují ke spáření se samicí velmi dlouhou dobu, až 17 dní (Shi et al., 2017). Studie zaměřená na hormony ukázala, že BPS má větší vliv na inhibici testosteronu než BPA, BPS tedy způsobí redukci sekrece testosteronu již po 3 dnech jeho

působení na organismus, kdy za tuto dobu nebyly zjištěny žádné změny u vystavení BPA. Ve stejné studii také vykázal BPS antiandrogenní efekt. Tato studie jako první dokazuje, že BPS je škodlivý stejně pro lidi jako pro hlodavce, a to v rámci jedné fyziologické funkce, to je důležité pro další studie, kde můžeme předpokládat stejný nebo alespoň podobný efekt expozice u lidské populace a u hlodavců (Eladak et al., 2015).

Studie na krysích samcích sledovala změny v oxidativním stresu ve varlatech a možný vliv na spermatogenezi, k detekci změn byla použita biochemie a histologie varlat. Markery oxidativního stresu ve varlatech jsou reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a úroveň peroxidace lipidů (LPO). V *in vitro* studii, kdy se varleční tkáň s BPS inkubovala pouze 2 hodiny, měly hodnoty LPO snižující se tendenci v závislosti na skupině BPS v porovnání s kontrolní skupinou, toto klesání bylo výrazné. U druhého markeru nebyly rozdíly signifikantní. Koncentrace testosteronu byla redukována v BPS skupinách v porovnání s kontrolní skupinou, ale redukce nebyla statisticky významná. Stejně tak nebyly významné rozdíly v koncentracích katalázy (CAT) a peroxidázy (POD) ve varlatech. Koncentrace superoxid dismutázy (SOD) byla zvýšená oproti kontrolní skupině v BPS skupině s nejvyšší koncentrací expozice, ostatní BPS skupiny se výrazně od kontrolní skupiny nelišily. Další část této studie probíhala *in vivo*, tedy hodnocená varlata pocházejí se sameců, kteří byli vystaveni po dobu 28 dní různým koncentracím BPS v dietě. V tomto případě expozice způsobila výrazné snížení aktivity SOD a CAT ve varlatech sameců ze skupiny s nejvyšší koncentrací expozice, v této skupině se lišila také aktivita POD a LPO. Zjištěné bylo také zvýšení ROS ve 2 skupinách s nižšími koncentracemi BPS, u ostatních skupin byly hodnoty ROS vysoké, ale bez významnějšího rozdílu od kontrolní skupiny. Koncentrace testosteronu v plasmě byly sniženy u všech BPS skupin v porovnání se skupinou kontrolní, ale významná redukce byla zaznamenána jen u skupin s nejnižší a nejvyšší koncentrací expozice BPS. U intratestikulárního testosteronu byla signifikantní redukce pouze u skupiny s nejvyšší koncentrací expozice (Ullah et al., 2016).

Ve studii pracující s potkany se neukázaly žádné rozdíly v tělesné hmotnosti a ve hmotnosti jednotlivých varlat u sameců vystavených různým koncentracím BPS a sameců v kontrolní skupině (Ullah et al., 2016). Stejně tak studie na myších samcích postnatálně vystavených BPS neukázala významné ovlivnění hmotnosti varlat ani celkové hmotnosti sameců (Shi et al., 2017).

Studie, která mimo jiné sledovala varleční tkáň ukázala, že semenotvorné kanálky jsou stejně uspořádané ve skupinách BPS jako v kontrolní skupině, ale epitel byl tenký a populace sekundárních spermatocytů byla u skupin vystavených BPS v porovnání s kontrolní skupinou potkanů rozptýlena. Objevilo se také pár tubulů, bez podlouhlých spermatid ve skupině

s největší koncentrací vystavení BPS. Tubuly v hlavě a ocasu nadvarlete nejevily žádné změny mezi skupinami. Byl redukován počet spermatocytů a spermatid u skupin vystavených BPS, ale tato redukce nebyla statisticky významná (Ullah et al., 2016).

S varlaty těsně souvisí také spermatogeneze, kdy spermatogenní cyklus lze rozdělit do dvanácti fází, které se dělí podle stádií vývoje spermatid. Postnatální vystavení myši BPS způsobilo lepší proliferaci tubulů ve stádiu sedm v porovnání s kontrolní skupinou a na druhé straně výrazně snižoval proliferaci tubulů ve fázi osm. Tento výsledek ukazuje různorodost efektu BPS na organismus (Shi et al., 2017).

Vystavení BPS má také vliv na redukci početnosti spermií, a to při expozici všem koncentracím BPS v porovnání s kontrolní skupinou samců. V této studii byla také testována motilita spermií a bylo zjištěno, že vystavení různým dávkám BPS motilitu spermií snižuje, v porovnání s hodnotami motilních spermií v kontrolní skupině (Shi et al., 2017).

Již review o BPS z roku 2015 ukazuje, že BPS není bezpečnější alternativou BPA, jak se zprvu předpokládalo. Závěrem tedy bylo, že BPS má téměř stejný potenciál a vliv na organismy, jako je tomu u BPA. Jelikož je BPS strukturním analogem BPA, dají se podobné vlastnosti předpokládat (Rochester and Bolden, 2015).

Experimentů vystavujících BPS savce je zatím málo, ale jsou důležité pro představu dopadu vystavování lidské populace BPS. Vzhledem ke vzrůstající neplodnosti mužů je důležité podrobit výzkumu vliv BPS na sperma, konkrétně jeho koncentraci, motilitu a viabilitu.

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Zvířata

Tento výzkum pracoval se zvířecími biomodely a všechny úkony s nimi spojené byly prováděny v souladu se zákonem 246/1992 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání a se schváleným projektem pokusů ID MŠMT – 11925/2016-3. Samci myši byli zakoupeni ve věku 4 týdnů od společnosti Velaz s.r.o. (Praha). Myši byly chovány v neporušených polykarbonátových nádobách při světelném režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy, při teplotě  $21 \pm 1$  °C a relativní vlhkosti 60 %. Myši měly k dispozici dietu bez fytoestrogenů 1814P (Altromin) a čistou vodu ve skleněných lahvích *ad libitum*. Po přijetí zvířat do výzkumu byla zvířata zvážena, náhodně rozřazena do 4 experimentálních skupin a nechala se po dobu jednoho týdne aklimatizovat. Následně byly myši exponovány BPS v těchto koncentracích: 0; 0,001; 1; 100 ng. g<sup>-1</sup>. bw<sup>-1</sup> (skupiny NC – negativní kontrola a BPS1-BPS3). Expozice probíhala pomocí pitné vody s respektem ke spotřebě vody na živou hmotnost myši, tedy přibližně 10 ml na samce za den, což odpovídalo dennímu příjmu BPS 0,038; 38 a 3800 ng (BPS1-BPS3), při hmotnosti samců 38 g. Délka expozice byla stanovena na 8 týdnů a představuje chronickou expozici endokrinním disruptorem.

**Tabulka č. 1:** Koncentrace expozice jednotlivých experimentálních skupin.

Experimentální skupina	Denní příjem na gram tělesné hmotnosti (ng. g <sup>-1</sup> . bw <sup>-1</sup> )	Denní příjem (ng)	Koncentrace ve vodě (ng/ml)
Negativní kontrola	0	0	0
BPS1	0,001	0,038	0,0038
BPS2	1	38	3,8
BPS3	100	3800	380

Hmotnost myši = 38 g, denní příjem vody = 10ml

## 4.2 Sběr vzorků

Po 8týdenní expozici myších samečů různým koncentracím BPS, byli samci zváženi a následně byli usmrceni cervikální dislokací. Ihned poté byla přerušena karotida a přímo z ní byla odebrána krev, která byla centrifugována a získané krevní sérum následně zmraženo na - 80 °C. Pro přístup do dutiny břišní byla provedena incize a pomocí chámovodů byla vytažena varlata ze šourku. Cauda nadvarlete s částí chámovodu sloužila pro získání spermií, varlata byla zvážena.

## 4.3 Zpracování myších spermií

Cauda nadvarlete spolu s částí chámovodu byly izolovány v 0,5 ml nekapacitujícího Whitten-Hepes médiu, které bylo v den odběru obohaceno o 1  $\mu$ l pyruvátu sodného na 1 ml média, přičemž koncentrace zásobního roztoku pyruvátu sodného byla 15 mg/170  $\mu$ l. Následně bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 7,2 – 7,4 za pomoci NaOH. Výsledné médium bylo uchováno po celou dobu ve vodní lázni o teplotě 37 °C.

Odebrané caudy nadvarlete s částí chámovodu v 0,5 ml Whitten-Hepes média byly pro dosažení vyplavání spermií uloženy po dobu 10 minut ve vodní lázni, následně byl zbytek tkáně odstraněn a suspenze spermií použita pro následné analýzy.

K měření koncentrace a motility byla použita Maklerova komora, do které bylo přeneseno 10  $\mu$ l vzorku. Spermie byly počítány ve 30 čtvercích komůrky a následně přepočítány na miliony v ml. Motilita spermií byla také hodnocena na Maklerově komůrce, a to subjektivně v procentech vyjadřujících motilní spermie.

## 4.4 Průtoková cytometrie

### 4.4.1 PNA/PI

Pro stanovení akrozomálního statusu a viability spermií byla použita kombinace propidium iodidu (PI) (ThermoFisher, V13243) a lektinu PNA (*Peanut agglutinin*) izolovaného z *Archis hypogaea*, který byl konjugován s fluoresceinem Alexa fluor 488 (ThermoFisher Scientific, L21409). Analýza proběhla u živých spermií na průtokovém cytometru.

Ve zkumavce pro průtokový cytometr (BD Falcon™ 5 ml) bylo 20  $\mu$ l suspenze spermií inkubováno s 200  $\mu$ l Whitten-Hepesova roztoku s obsahem 10  $\mu$ M PI a 10  $\mu$ g/ml PNA po dobu

30 minut ve tmě. Následně byly takto připravené vzorky podrobené analýze na průtokovém cytometru FACSVerse (BD, Biosciences). Celkově bylo analyzováno 2000 událostí (spermií), přičemž pro excitaci PI a PNA byl použit modrý laser (488nm). PI bylo detekováno filtrem PE (586/42) a PNA filtrem FITC (537/32). Výsledkem byly 4 populace: živé s neporušeným akrozomem (PI<sup>-</sup>/PNA<sup>+</sup>), mrtvé s neporušeným akrozomem (PI<sup>+</sup>/PNA<sup>-</sup>), mrtvé s porušeným akrozomem (PI<sup>+</sup>/PNA<sup>+</sup>) a živé spermie s porušenou integritou akrozómu (PI<sup>-</sup>/PNA<sup>+</sup>).

#### 4.4.2 SCSA

Pro hodnocení efektu BPS na integritu DNA spermií byla použita metoda Sperm chromatin structure assay (SCSA) dle Evenson. Tento test je založený na citlivosti DNA spermií k její denaturaci v kyselém prostředí s pH o hodnotě 1,2 a následnou inkubací s metachromatickým barvivem akridinovou oranží, emisní spektrum tohoto barviva se pohybuje od zelené (dvouvláknová DNA; dsDNA), po červenou (jednovláknová DNA; ssDNA) (Evenson et al., 2002).

50  $\mu$ l homogenizované suspenze spermií byla smíchána se 150  $\mu$ l TNE pufru (0,15 M NaCl; 0,01 M Tris HCl; 1 mM EDTA; pH 7,4) a okamžitě zmrazena v tekutém dusíku. Následně byly takto připravené vzorky uchovány při teplotě -80 °C do doby analýzy na průtokovém cytometru.

Před začátkem analýzy byly vzorky umístěné na led, kde došlo k postupnému rozmrazení, navíc byl ještě připraven roztok kyselého detergentu (0,08 M HCl; 0,15 M NaCl; 0,1 % Triton \* 100; pH 1,4) a také roztok akridinové oranže (0,037 M citric acid; 0,126 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,0011 M disodium EDTA; 0,15 M NaCl; pH 6,0; 4 °C), které byly po dobu analýzy uchovány na ledu. Ve zkumavce pro průtokový cytometr (BD Falcon™ 5 ml) bylo smícháno 200  $\mu$ l roztoku kyseliny, působícího jako detergent a inkubováno po dobu 30 sekund, následně bylo přidáno 1,2 ml roztoku akridinové oranže a po 2 minutách byla uskutečněná samotná analýza.

Pomocí průtokového cytometru FACSVerse (BD, Biosciences). Na začátku analýzy průtokovým cytometrem byl nejprve vybrán jeden vzorek z kontrolní skupiny jako standard (standartní vzorek), u kterého byly nastaveny průměrné hodnoty levelu zelené a červené fluorescence pro jednotlivé filtry FITC a PerCP na hodnoty 118750 a 31250. Celá následná analýza vzorků probíhala při daném nastavení. U každého vzorku bylo analyzováno minimálně 2000 událostí (spermií), přičemž pro excitaci akridinové oranže byl použit modrý laser (488nm). Červená fluorescence byla detekována filtrem PerCP (700/54) a zelená fluorescence filtrem FITC (537/32). Výsledný index DNA fragmentace (DFI) je vypočítán na základě

poměru intenzity červené fluorescence k fluorescenci celkové (červená/ [červená + zelená] \*100).

#### **4.5 Statistické hodnocení**

Statistické hodnocení dat ze všech experimentů probíhalo v programu Statistica (StatSoft ČR, s.r.o) a k vyhodnocení statistických rozdílů byla použita jednofaktorová ANOVA. Rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny Fisherovým post-hoc testem v případě normálního rozdělení. V případě nenormálního rozdělení byl použit Kruskal-Wallisův test a pro vyhodnocení rozdílů mezi skupinami Mann-Whitneyův test. Všechny testy byly prováděny při hladině významnosti  $P=0,05$ .



## 5 Design experimentu

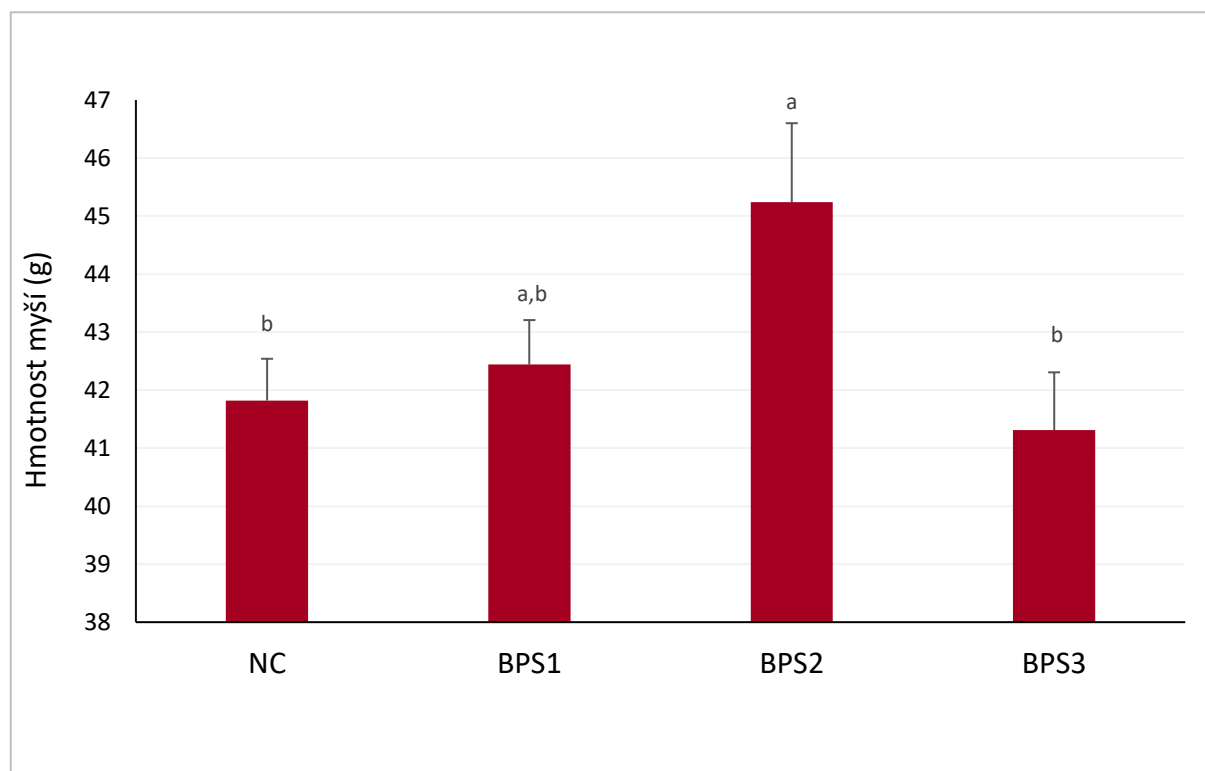
Pro experiment byli použiti samci myši outbredního kmene CD1. V každé experimentální skupině bylo 12 samců ve čtyřech opakování. Doba expozice samců koncentracím BPS rozpuštěných ve vodě trvala 8 týdnů.

V tomto experimentu bylo hodnoceno sperma myších samců. V první řadě základní údaje spermatu, koncentrace spermií v milionech na mililitr a procento motilních spermií. V dalším kroku se spermie hodnotily na základě molekulárních markerů pomocí průtokové cytometrie, jejíž pomocí byla hodnocena akrosomální reakce (PNA/PI) a fragmentace DNA pomocí SCSA (Sperm chromatin structure assay). Pro budoucí pokračování výzkumu byla odebrána krev pro analýzu hormonálního profilu, varlata pro hodnocení histologické a proteomické a pro doplňující imunolokalizaci vybraných markerů byly ze spermií připraveny roztěry na sklíčka. Experiment probíhal zaslepeně, to znamená, že při zpracování vzorků nebyla známa experimentální skupina myši, hodnocení tedy nebylo ovlivněno znalostí skupiny hodnocené myši.

## 6 Výsledky

### 6.1 Hmotnost myší

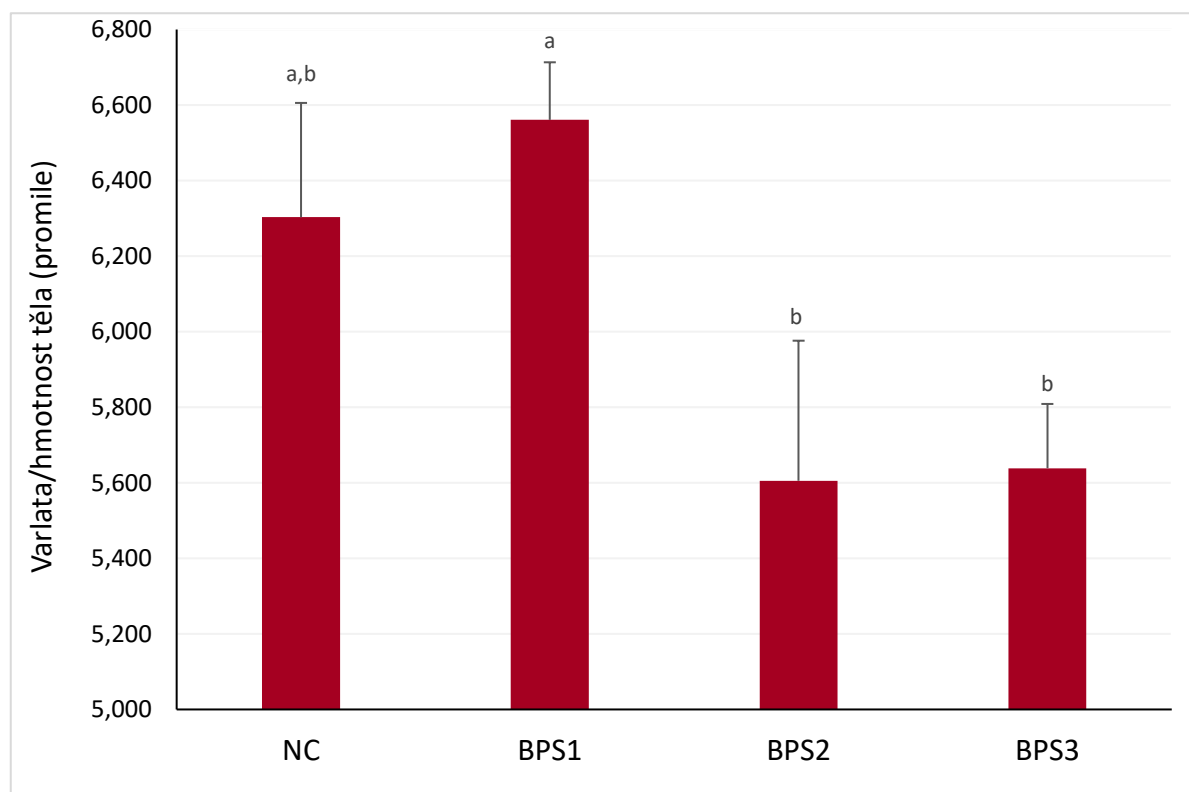
Cílem bylo zjistit rozdíl v živé hmotnosti samců v závislosti na experimentální skupině, rozdíly jsou graficky znázorněné na obrázku č. 2. Statistické vyhodnocení ukázalo statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou BPS2 ( $45,24 \pm 1,36$  pro BPS2 versus  $41,82 \pm 0,72$  pro negativní kontrolu), dále také mezi skupinou BPS2 a BPS3. Z výsledků je zřejmé, že u BPS2 skupiny je signifikantní nárůst hmotnosti o 3,42 g v porovnání se skupinou kontrolní. Podrobné hodnoty statistického vyhodnocení jsou v příloze č.2.



**Obrázek č.2:** Rozdíly hmotnosti samců myší mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Různé superskripty označují statisticky významné rozdíly ( $P \leq 0,05$ ).

## 6.2 Poměr hmotnosti varlat a hmotnosti těla

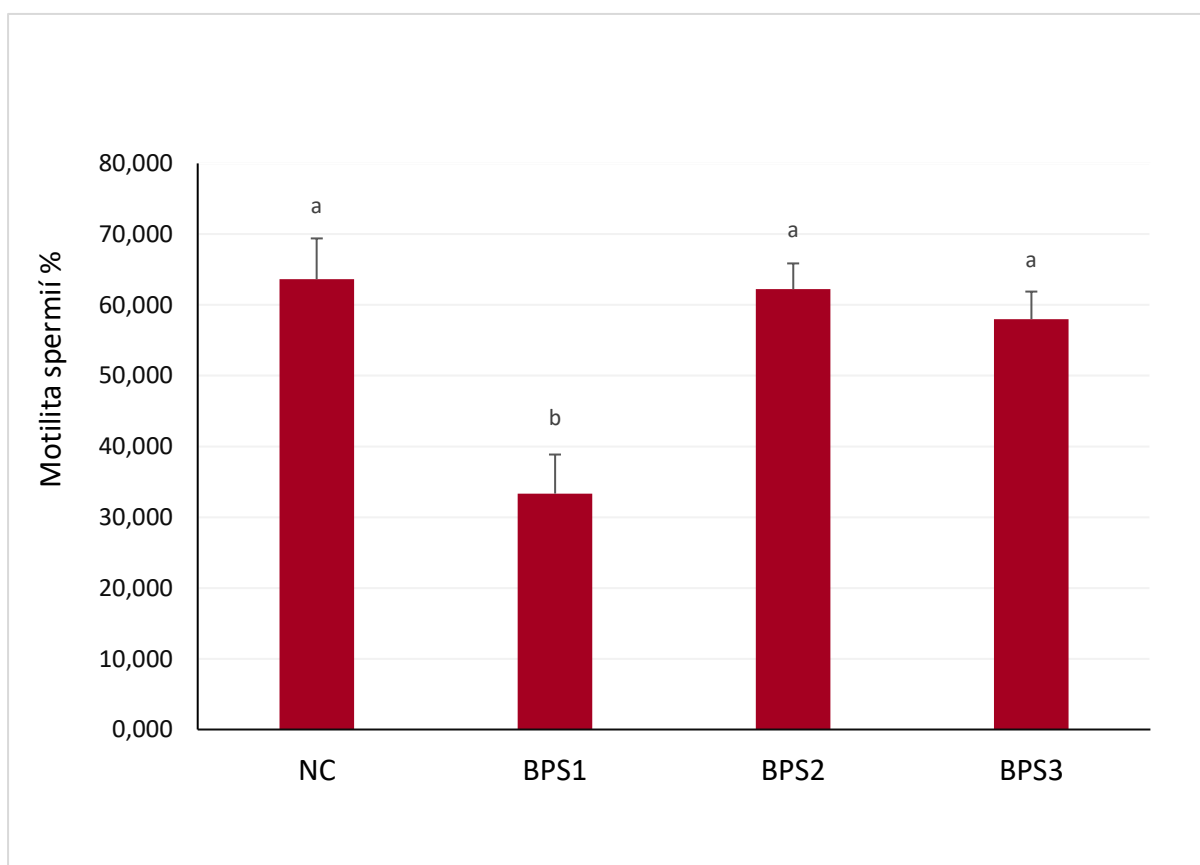
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit rozdíl hmotnosti varlat mezi experimentálními skupinami samců, znázornění rozdílů na obrázku č. 3. Pro objektivní hodnocení byl vypočítán poměr hmotnosti varlat k hmotnosti těla a přečítán na promile. Statistickým vyhodnocením byl zjištěn rozdíl mezi skupinami BPS1 a BPS2 ( $6,56 \pm 0,15$  pro BPS1 versus  $5,6 \pm 0,37$  pro BPS2) a mezi skupinami BPS1 a BPS3 ( $6,56 \pm 0,15$  pro BPS1 versus  $5,64 \pm 0,17$  pro BPS3). U skupiny BPS1 je významně vyšší poměr hmotnosti varlat a hmotnosti těla oproti dalším dvěma BPS experimentálním skupinám. Podrobné statistické vyhodnocení je uvedené v příloze č. 3.



**Obrázek č. 3:** Rozdíly relativní hmotnosti varlat mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Různé superskripty označují statisticky významné rozdíly ( $P \leq 0,05$ ).

### 6.3 Motilita spermií

Cílem experimentu bylo prověřit rozdílnost v procentu motilních spermií mezi experimentálními skupinami samců myši. Grafické znázornění rozdílů mezi skupinami na obrázku č. 4. Motilita spermií byla počítána v Markelově komůrce v procentech motilních spermií. Statistické vyhodnocení ukázalo statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou BPS1 a dále mezi skupinou BPS1 a BPS2 i skupinou BPS3. Z výsledků je zřejmé, že BPS v nejnižší koncentraci snižuje motilitu spermií o 30 % ( $63,64 \pm 5,76$  pro kontrolní skupinu versus  $33,3 \pm 5,53$  pro BPS1) oproti kontrolní skupině. Podrobné hodnoty statistického vyhodnocení v příloze č. 4.

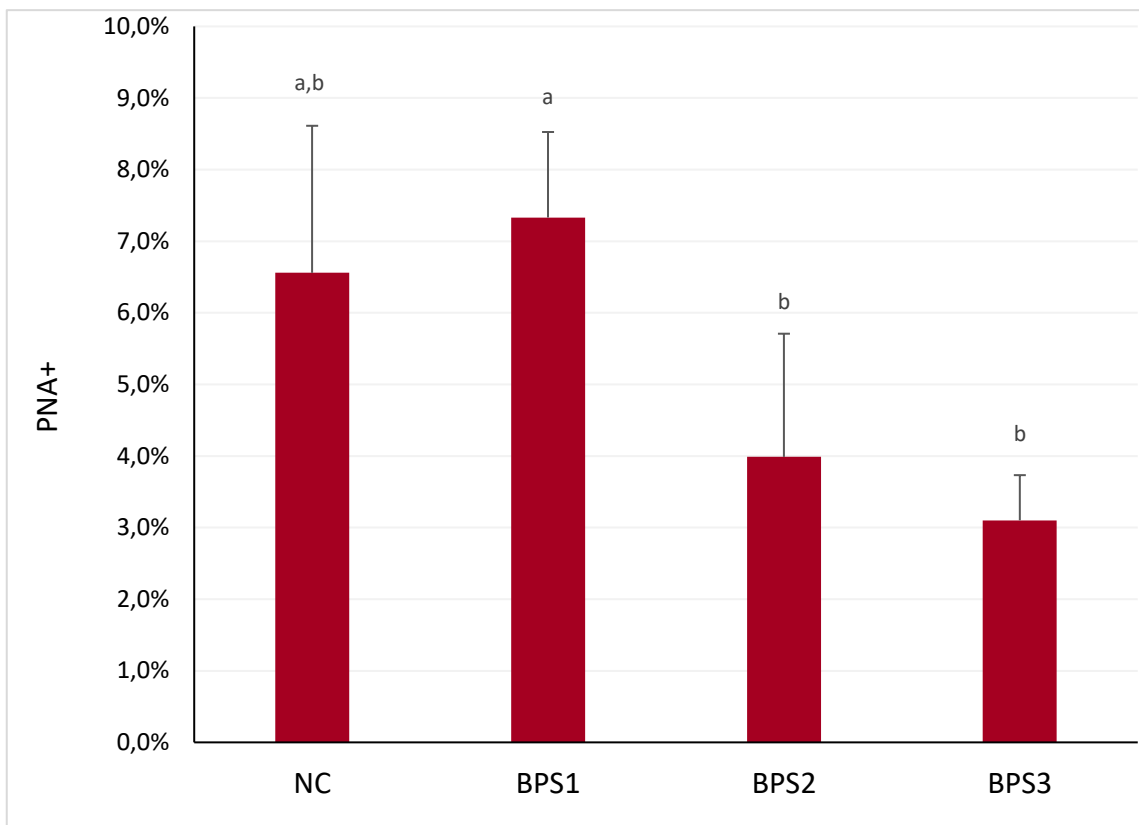


**Obrázek č. 4:** Rozdíly v procentu motilních spermií mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Různé superskriptory označují statisticky významné rozdíly ( $P \leq 0,05$ ).

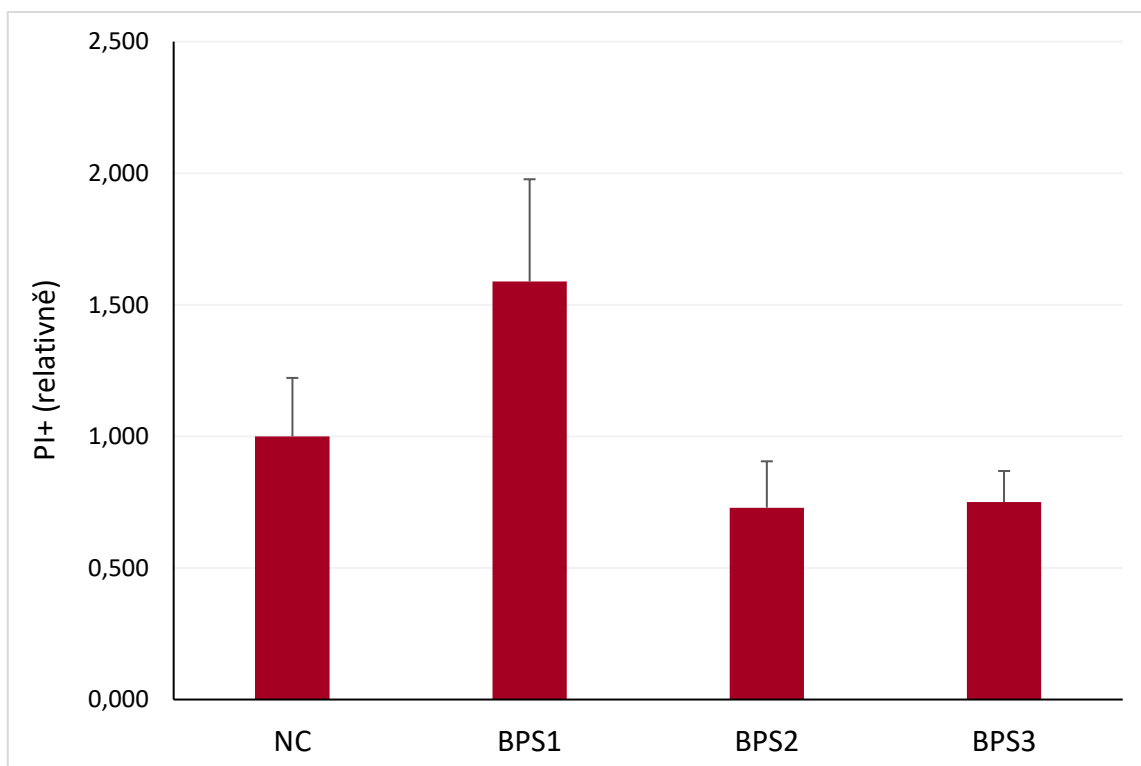
## **6.4 Průtoková cytometrie**

### **6.4.1 Analýza integrity akrozómu a viability spermií**

Cílem experimentu bylo zjistit akrozomální status a viabilitu spermií za pomoci průtokového cytometru. K této analýze byla použita kombinace PNA a PI. PNA i PI negativní buňky znamenají buňky zdravé, PI pozitivní buňky jsou buňky mrtvé a PNA pozitivní buňky značí proběhlou akrozomální reakci. Grafické znázornění rozdílů v procentu PNA+ buněk na obrázku č. 5 a PI+ buněk na obrázku č. 6. Statistickým vyhodnocením byl zjištěn statisticky významný rozdíl PNA pozitivních buněk. Statisticky významný rozdíl byl zjištěn mezi skupinou BPS1 a BPS2 ( $7,3 \pm 0,01$  pro BPS1 versus  $4 \pm 0,02$  pro BPS2), stejně tak mezi skupinou BPS1 a BPS3 ( $7,3 \pm 0,01$  pro BPS1 versus  $3,1 \pm 0,01$  pro BPS3). Procento PNA pozitivních buněk je u skupiny BPS1 o 4,1 % vyšší než u skupiny BPS3. V relativním počtu PI pozitivních buněk nebyl nalezen žádný statistický rozdíl. Podrobné statistické vyhodnocení v příloze č. 5.



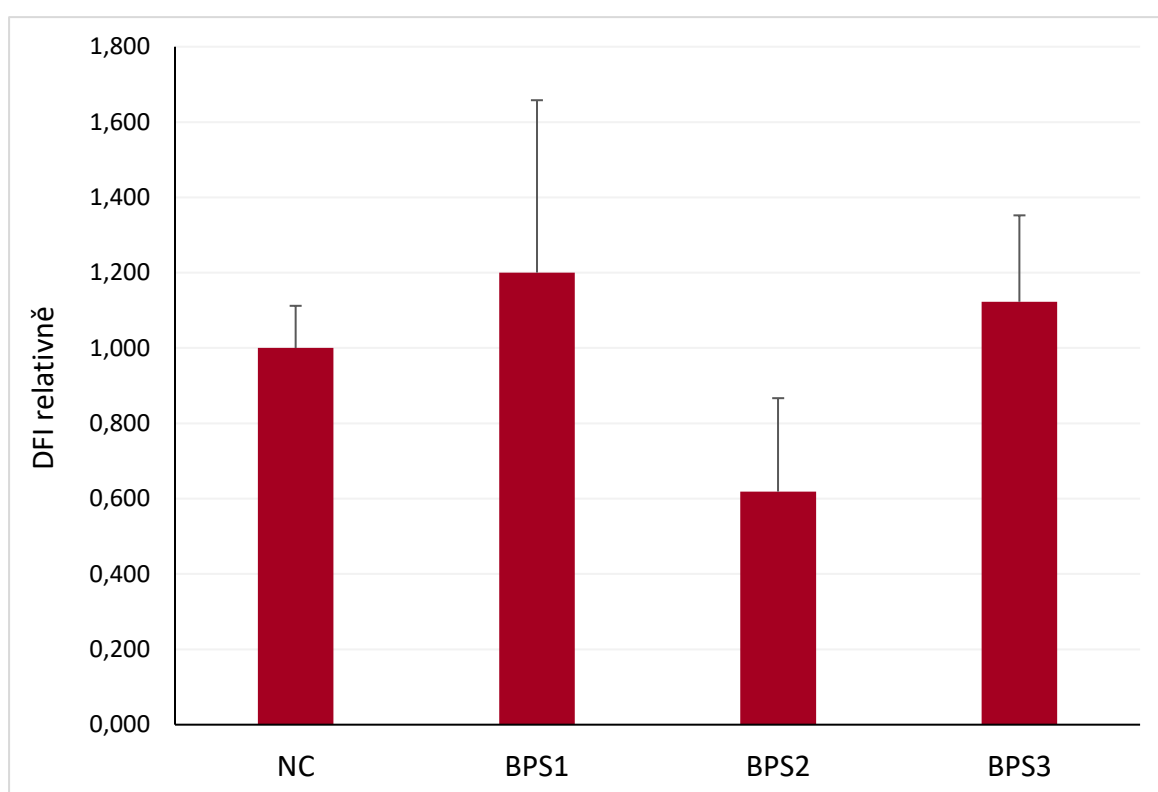
**Obrázek č. 5:** Rozdíl v procentu PNA pozitivních buněk mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Různé superskripty označují statisticky významné rozdíly ( $P \leq 0,05$ ).



**Obrázek č. 6:** Rozdíly v relativním množství PI pozitivních buněk mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Mezi skupinami není žádný statisticky významný rozdíl.

#### 6.4.2 Analýza integrity DNA prostřednictvím SCSA

Cílem této analýzy bylo zjistit stav integrity DNA ve spermích pomocí metody SCSA, která je založena na citlivosti DNA spermií k denaturaci v kyselém prostředí. Grafické znázornění rozdílů mezi skupinami na obrázku č. 7. Výsledkem analýzy je pak DFI, což je index DNA fragmentace. Mezi skupinami nevyšel žádný statisticky významný rozdíl. Zvýšení je naznačené u skupiny BPS1, ale není zde statisticky významný rozdíl.



**Obrázek č. 7:** Rozdíl v relativním indexu DNA fragmentace mezi jednotlivými experimentálními skupinami, Mezi skupinami není žádný statisticky významný rozdíl.

## 7 Diskuze

Používání BPS v posledních letech roste společně s omezováním používání BPA. Zatím se zabývalo negativním vlivem BPS na savce jen několik studií (Ullah et al., 2016; Shi et al., 2017; Eladak et al., 2015), které ukazují, že BPS není bezpečná alternativa BPA, jak se původně myslelo. Je předpokládáno, že BPS je podobně nebezpečný pro organismy, jako je tomu u BPA (Molina-Molina et al., 2013).

Tento experiment ukázal vliv BPS na rozdílnou hmotnost myších samců, u vystavení nízkým koncentracím BPS byl pouze nepatrný nárůst hmotnosti samců, ale u skupiny vystavené středním koncentracím BPS ( $1 \text{ ng. g}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$ ; BPS2) byl nárůst hmotnosti oproti kontrolní skupině signifikantní. Můžeme říct, že BPS2 působí jako obezogen. Vysoké koncentrace BPS na hmotnost samců již ale nepůsobily. Expozice myší podobným koncentracím BPA měla také obezogenní účinek (Marmugi et al., 2012). Experiment studující BPS ukazuje signifikantně zvýšenou hmotnost samců myší u chronické expozice koncentracemi  $1,5$  a  $50 \text{ } \mu\text{g. kg}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$  (Del Moral et al., 2016). U lidské populace byla zjištěna korelace mezi koncentrací BPA v moči nebo krvi s nadváhou (Rochester, 2013). Podobně působí expozice na potomky samců, kteří byli BPA vystaveni, 4 týdny po narození je jejich hmotnost signifikantně vyšší (Dobrzyńska et al., 2015). Opačný případ byl popsán u samců myší, kteří byli vystaveni BPA prenatálně středním koncentracím. Dospělí samci po této expozici měli signifikantně nižší hmotnost než samci z kontrolní skupiny (vom Saal et al., 1998). Studie vystavující myší samce koncentracím BPA také po dobu 8 týdnů, neukázala žádné rozdíly ve hmotnostech samců mezi skupinami u žádné koncentrace expozice (Takao et al., 1999). Vystavení samcům vysokým koncentracím BPA ( $300$  a  $600 \text{ mg. kg}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$ ) způsobilo po 8 týdnech expozice mírné snížení hmotnosti oproti kontrolní skupině (Tian et al., 2017). Týmy zabývající se výzkumem vlivu BPS nezjistily jeho vliv na hmotnost těla ani na hmotnost varlat (Shi et al., 2017; Ullah et al., 2016).

V našem experimentu byla hodnocena relativní hmotnost varlat (hmotnost varlat v poměru k hmotnosti těla). U nejnižší koncentrace BPS (BPS1) bylo zjištěno mírné, ale nesignifikantní, zvýšení poměru, dvě další skupiny vystavené vyšším koncentracím BPS (BPS2 a BPS3) měly signifikantně nižší poměr hmotnosti varlat ku hmotnosti těla v porovnání s kontrolní skupinou a skupinou BPS1. Ačkoliv nebyl nalezen signifikantní rozdíl v relativní hmotnosti varlat mezi kontrolní skupinou a skupinami exponovanými BPS, je naznačen úbytek relativní hmotnosti varlat u skupin BPS2 a BPS3 oproti skupině kontrolní. Podobný výsledek ukázala studie na myších samcích vystavených BPA po dobu 8 týdnů. Zde se relativní hmotnost



varlat snižovala s rostoucí koncentrací expozice (Tian et al., 2017). Hmotnost varlat byla snížena expozicí vysokým koncentracím BPA také u potkanů (Dere et al., 2017). Studie vystavující myši BPA neukazuje žádný významný rozdíl ve hmotnosti varlat (Takao et al., 1999). Naopak u myších samců vystavovaných koncentracím BPA po dobu 30 dní byl zjištěn nárůst relativní hmotnosti varlat, signifikantní rozdíl byl u skupiny samců vystavených středním koncentracím BPA v porovnání s kontrolní skupinou (Al-Hiyasat et al., 2002).

Procento motilních spermií, které bylo počítáno pomocí Merkelovy komůrky, bylo výrazně sníženo u skupiny samců, kteří byli vystaveni nejnižším koncentracím BPS (BPS1), oproti skupině kontrolní. Skupiny vystavené středním a vysokým koncentracím BPS (BPS2 a BPS3) se od kontrolní skupiny příliš nelišily. Motilita spermií vypovídá mnoho o kvalitě spermatu obecně, lze tedy říci, že nízké koncentrace BPS negativně působí na kvalitu spermatu samců myši. Již předchozí studie potvrdila snižující se procento motilních spermií pod vlivem BPS (Shi et al., 2017). Při expozici BPA dochází ke snížení procenta motilních spermií u myši se vzrůstající koncentrací BPA (Wang et al., 2016). Nízké koncentrace BPA také způsobují významné snížení motilních spermií u myši (Kaur et al., 2017). Ke stejnému zjištění došla i další studie vystavující samce myši BPA (Rahman et al., 2015). Studie porovávající efekt BPA a jeho analogů na reprodukci myších samců zjistila snížené procento motility u samců vystavených vysokým koncentracím ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$  a  $10 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$ ) BPA, BPE i BPS (Shi et al., 2017). Ke snížení motility také došlo u potomků myších samců, kteří byli vystaveni BPA (Dobrzyńska et al., 2015) a samců, jejichž matky byly vystaveny koncentracím BPA (Kalb et al., 2016).

K hodnocení viability spermií a integrity akrozómu bylo využito průtokové cytometrie. K analýze byla použita kombinace PNA/PI. PNA pozitivní spermie jsou spermie, které mají porušený akrozóm, došlo ke spontánní akrozomální reakci. PI pozitivní buňky jsou buňky mrtvé. Statisticky významný rozdíl byl zjištěn u relativního počtu PNA pozitivních buněk mezi skupinami BPS1 a BPS2 a mezi skupinami BPS1 a BPS3. S kontrolní skupinou nebyl detekován žádný signifikantní rozdíl, ale oproti kontrolní skupině je vyšší hodnota PNA pozitivních buněk u skupiny BPS1. U experimentálních skupin vystavených vyšším koncentracím BPS (BPS2 a BPS3) je naznačen pokles PNA pozitivních buněk oproti kontrolní skupině, tyto rozdíly ale nejsou statisticky významné. V dalších opakováních by bylo třeba se zaměřit na to, jestli nízké koncentrace BPS skutečně zvyšují počet PNA pozitivních buněk, buněk s předčasnou akrozomální reakcí. Podobně tak mrtvé spermie, PI pozitivní, se nejvíce vyskytovaly ve skupině s nejnižší koncentrací expozice BPS (BPS1), oproti ostatním skupinám, žádný z rozdílů nebyl statisticky významný. Zvýšení výskytu mrtvých spermií ve skupině BPS1

odpovídá zvýšenému počtu PNA pozitivních buněk, nízké koncentrace BPS také snížily procento motilních spermií. Z těchto výsledků můžeme přechíst, že nízké koncentrace BPS působí negativně na reprodukční kapacitu samců. Samci myši exponovaní BPA vykázali snižující se hodnoty spontanní akrozomální reakce se zvyšujícími se koncentracemi vystavení (Wang et al., 2016). *In vitro* expozice myších spermií BPA indukovala předčasnou akrozomální reakci při koncentraci 100  $\mu$ M BPA (Rahman et al., 2015). Při expozici *in vitro* potkaních spermií tak i *in vivo* expozice potkanů BPA dochází k urychlení kapacitační reakce spermií (Wan et al., 2016).

Integrita DNA spermií byla analyzována pomocí metody SCSA. Mezi skupinami nebyl žádný statisticky významný rozdíl, avšak ve skupinách BPS1 a BPS3 je mírné zvýšení fragmentace DNA oproti kontrolní skupině a skupině se střední koncentrací expozice (BPS2). Samci myši exponovaní koncentracím BPA vykazují zvýšenou úroveň poškozené DNA u všech experimentálních skupin 24 hodin po ukončení expozice, pět týdnů od ukončení expozice se vyskytovala poškozená DNA jen u skupin s nejvyššími koncentracemi expozice BPA (Dobrzyńska and Radzikowska, 2013). Výskyt poškozené DNA koreluje s výskytem koncentrace BPA v moči mužů (Meeker et al., 2010). Studie vystavující lidské spermie BPA *in vitro* také ukázala zvýšený výskyt poškozené DNA (Barbonetti et al., 2016). Experiment vystavující koncentracím BPA rybí spermie ukazuje výrazně zvýšený výskyt fragmentace DNA ve spermiích (Hulak et al., 2013). Integrita DNA byla snížena u samců myši u všech experimentálních skupin, velké snížení bylo především u skupin samců exponovaných vysokým koncentracím BPA (Kalb et al., 2016).

Tato diplomová práce byla založena na základě mnohých zjištění o negativním vlivu BPA na reprodukční funkce samců (Mínuquez-Alarcón et al., 2016). Cílem bylo otestovat vliv vystavení BPS na reprodukční kapacitu samců myši a srovnat vliv expozice BPS s působením expozice BPA. V experimentu jsme hodnotili hmotnost samců, relativní hmotnost varlat, procento motilních spermií, viabilita spermií a integrita DNA. Na zvýšení hmotnosti působila skupina BPS2, tato koncentrace expozice působila obezogeně, což bylo potvrzeno i u BPA (Marmugi et al., 2012). Relativní hmotnost varlat byla snížena při expozici vyšším koncentracím BPS (BPS2 a BPS3), podobně tak bylo popsáno u BPA (Tian et al., 2017; Dere et al., 2017). Motilita spermií byla snížena po expozici nízkým koncentracím BPS (BPS1), BPA snižuje motilitu ve všech koncentracích expozice (Wang et al., 2016). Pokles viability spermií byl zjištěn u vyšších koncentrací BPS a u těchto skupin byl zjištěn i mírný nárůst fragmentace DNA.

Odlišnosti ve výsledcích mezi různými experimenty mohou být způsobené odlišným druhem exponovaného živočišného druhu, různě dlouhá doba expozice, rozdílné použití analýzy pro detekci jednotlivých parametrů.

Z výsledků tohoto experimentu lze předpokládat, že BPS bude mít podobné účinky na reprodukční funkce samců jako BPA.

## 8 Závěr

V současné době jsou organismy obklopené velkým množstvím chemických látek, které ovlivňují jejich fungování různým způsobem. Velká pozornost se věnuje dopadu EDCs na organismy. Důkladně prozkoumaným EDCs je BPA. Mnohé studie experimentující s touto látkou dokázaly její negativní dopad na organismy v různých ohledech. Škodlivý vliv, především na lidskou populaci, vedl k omezení používání BPA. Jako alternativa se následně začal používat BPS, analog BPA. Skutečnost, že je BPS analogem škodlivého BPA vedlo k obavám, že BPS bude mít podobně škodlivé účinky jako BPA, a proto se jeho toxicita začala testovat. V současné době je jen omezené množství poznatků o účincích BPS.

Zjistili jsme, že BPS ve střední koncentraci ( $1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$ ; BPS2) působí nárůst hmotnosti myších samců, tedy působí obezogeně. BPS působil také na relativní hmotnost varlat, kdy tato hodnota klesala při expozici střední ( $1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$ ; BPS2) a vysoké ( $100 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$ ; BPS3) koncentraci oproti skupině BPS1 ( $0,001 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$ ). Pokles procenta motilních spermií ve skupině BPS1 značí sníženou viabilitu spermií pod vlivem vystavení BPS. Také spermií s porušeným akrozómem bylo zvýšené množství ve skupině BPS1. Mezi mrtvými buňkami nebyl naměřen statisticky významný rozdíl, ale bylo naznačeno, že jejich počet stoupá ve skupině BPS1. Naše pozorování ukazují, že BPS nepředstavuje bezpečnou alternativu BPA a můžeme potvrdit hypotézu, že BPS negativně ovlivňuje reprodukční kapacitu samců myší.

V dalších experimentech by bylo zajímavé zaměřit se na další aspekty samčí reprodukce, jako jsou sexuální chování, plodnost samců, hladiny hormonů v krevním séru, histologická stavba varlat a například mezigenerační vliv BPS, podobně jako je spoustou publikací potvrzeno u BPA. Obecně o BPS je potřeba zjistit podrobnosti o mechanismu účinku na organismy, k čemuž by posloužila proteomická analýza, která by mohla odhalit narušení funkce proteinů pracujících jako signální molekuly. K poznání účinků BPS bude potřeba například také genetických analýz. Jen komplexní poznání působení BPS na organismy a následná opatření mohou eliminovat dopad na lidskou populaci.

## 9 Seznam použité literatury

Al-Hiyasat, A. S., Dermani, H., Elbetiega, A. M. 2002. Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *European Journal of Oral Sciences*. 110. 163-167.

Arnika. Toxické látky [online]. 2014. [cit. 2015-11-26]. Dostupné z <<http://arnika.org/toxickelatky>>.

Barbonetti, A., Castellini, Ch., Di Giammarco, N., Santilli, G., Francavilla, S., Francavilla, F. 2016. In vitro exposure of human spermatozoa to bisphenol A induces pro-oxidative apoptotic mitochondrial dysfunction. *Reproductive Toxicology*. 66. 61-67.

Barrett, J. R. 2013. Assessing the Safety of a Replacement Chemical: Nongenomic Activity of Bisphenol S. *Environmental Health Perspectives*. 121 (3). 97.

Berger, R. G., Hancock, T., deCatanzaro, D. 2007. Influence of oral and subcutaneous bisphenol A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice. *Reproductive Toxicology*. 23 (2). 138-144.

Berger, R. G., Shaw, J., deCatanzaro, D. 2008. Impact of acute bisphenol A exposure upon intrauterine of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17beta-estradiol. *Reproductive Toxicology*. 26 (2). 94-99.

Boucher, J. G., Ahmed, S., Atlas, E. 2016. Bisphenol S induces adipogenesis in primary human preadipocytes from female donors. *Endocrinology*. 157 (4). 1397-1407.

Cabaton, N. J., Wadia, P. R., Rubin, B. S., Zalko, D., Schaeberle, C. M., Askenase, M. H. 2011. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environmental Health Perspection*. 119 (4). 547-552.

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, E., Skakkebaek, N. E. 1992. Evidence for decreasing quality of sperm during past 50 years. *BMJ*. 305 (6854). 609-613.

- Caserta, D., Maranghi, L., Mantovani, A., Marci, R., Maranghi, F., Moscarini, M. 2008. Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. *Human Reproduction*. 14 (1). 59-72.
- Cheek, A. O., Kow, K., Chen, J., et McLachlan, J. A. 1999. Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin and thyroid-binding globulin. *Environmental Health Perspectives*. 107 (4). 273276.
- Chen, M. Y., Ike, M., Fujita, M. 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environmental toxicity*. 17 (1). 80-86.
- Chen, Y., Shu, L., Qui, Z., Lee, D. Y., Settle, S. J., Que Hee, S., Telesca, D., Yang, X., Allard, P. 2016. Exposure to BPA- substitute bisphenol S causes unique alternations of germline function. *PLOS Genetics*. 12 (7). e1006223.
- Cocuzza, M. and Esteves, S. C. 2014. Shedding light on the temporal decline in human sperm counts: a systematic review. *The Scientific World Journal*. 2014. 365691.
- Colborn, T. and Clement, C. 1992. Chemically-Induced Alternations in Sexual and Functional Development. *Advances in modern environmental toxicology (USA)*. 21. 403.
- Colborn, T. *Environmental Health Perspective*. Neurodevelopment and Endocrine Disruption [online]. National Institute of Health Sciences. June 2004. [cit. 2015-24-11]. Dostupné z: < <http://www.jstor.org/stable/3838094>>.
- Colborn, T., vom Saal, F. S., Soto, A. M. 1993. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives*. 101. (5). 378-384.
- Cunha, G. R., Boutin, E. L., Turner, T., Donjacour, A. A. 1992. Role of mesenchyme in the development of the urogenital tract. In: *Chemically induced alternations in sexual and functional development: the wildlife/human connection* (Colborn, T., Clement, C., eds). Princeton scientific publishing. 85-105.

Danzl, E., Sei, K., Soda, S., Ike, M., Fujita, M. 2009. Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 6 (4). 1472-1484.

Dare, E., Anderson, L. M., Huse, S. M., Spade, D. J., McDonnell-Clark, E., Madnick, S. J., Hall, S. J., Camacho, L., Lewis, S. M., Vanlandingham, M. M., Boekelheide, K. 2017. Effects of continuous bisphenol A exposure from early gestation on 90 day old rat testes function and sperm molecular profiles: A CLARITY-BPA consortium study. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Dostupné také z: <<https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.03.021>>

Del Moral, L. I., Corre, L. L., Poirier, H., Niot, I., Truntzer, T., Merlin, J.-F., Rouimi, P., Besnard, P., Rahmani, R., Chagnon, M. C. 2016. Obesogen effects after perinatal exposure of 4,4'-sulfonyldiphenol (Bisphenol S) in C57BL/6 mice. *Toxicology*. 357-358. 11-20.

Diamanti-Kandarakis, E., Borguignon, J. P., Guidice, L. C., Hauser, R., Prins, G. C., Soto, A. M., Zoeller, R. T., Gore, A. C. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*. 30(4). 293-342.

Dobrzyńska, M. M. and Radzikowska, J. 2013. Genotoxicity and reproductive toxicity of bisphenol A and X-ray/bisphenol A combination in male mice. *Drug and Chemical Toxicology*. 36(1). 19-26.

Dobrzyńska, M. M., Gajowik, A., Radzikowska, J., Tyrkiel, E. J., Jankowska-Steifer, E. A. 2015. Male-mediated F1 effects in mice exposure to bisphenol A, either alone or in combination with X-irradiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 789-790. 36-45.

Dodds, E. C., Lawson, W. 1936. Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137 (3476). 996.

EFSA. 2010. Scientific report of the Endocrine Active Substances Task Force. *EFSA Journal*. 8 (11). 1932.

EFSA. 2018. Bisphenol A. Dostupné z: <  
<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol>>.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouille-Fabre, V., Habert, R. 2015. A new chapter in the bisphenol A: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility* 103 (1). 11-21.

Eur-Lex. 2011. Commission Directive 2011/8/EU of 28 January 2011. Online. Dostupné z: <  
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32011L0008>>.

Evenson, D. P., Larson, K. L., Jost, L. K. 2002. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*. 23 (1). 25-43.

Faqi, A. S., Dalsenter, P. R., Marker, H. J., Chahoud, I. 1998. Effects on developmental landmarks and reproductive capability of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in offspring of rats exposed during pregnancy. *Human and Experimental Toxicology*. 17 (7). 365-372.

Feng, Y., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., Guo, Q., Shao, B. 2016. Effect of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere* 147. 9-19. Mechanisms of Actions on Behavior and neuroendocrine Systems. NIH Public Access 24(1). 144-159.

Givercman, A., Chairman, Givercman, Y. L. 2011. Environmental factors and testicular function. *Best practise & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 25. 391-402.

Giwerzman, Y. L., Giwerzman, A., Rylander, L. 2007. Influence of endocrine disruptors on human male fertility. *Reproductive BioMedicine*. 15 (6). 633-642.



Glausiuz, J. 2014. The plastic puzzle. *Nature* 508 (7496). 306-308.

Grignard, E., Lapenna, S., Bremer, S. 2012. Weak estrogenic transcriptional activities of bisphenol A and bisphenol S. *Toxicology in vitro*. 26 (5). 727-731.

Gore, A. C. 2007. *Endocrine-Disrupting Chemicals*. Human Press. New Jersey. p. 361. ISBN: 978-1-59745-107-9.

Guillette, L. J. Jr., Parrott, B. B., Nilsson, E., Haque, M. M., Skinner, M. K. 2016. Epigenetic programming alterations in alligators from environmentally contaminated lakes. *General and Comparative Endocrinology*. 238. 4-12.

Hagger, J. A., Depledge, M. H., Oehlmann, J., Jobling, S., Galloway, T. S. 2006. Is there a causal association between genotoxicity and the imposex effects? *Environmental Health Perspectives*. 114 (1). 20-26.

Handelsman, D. J. 2001. Estrogens and falling sperm counts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 13 (4). 317-324.

Hill, C. E., Sapouckey, S. A., Suvorov, A., Vandenberg, L. N., Schumacher, U. 2017. Developmental exposures to bisphenol S, a BPA replacement, alter estrogen-responsiveness of the female reproductive tract: a pilot study. *Cogent Medicine*. 4.

Hotchkiss, A. K., Rider, C. V., Blystone, C. R., Wilson, V. S., Hartig, P. C., Ankley, G. T., Foster, P. M., Gray, C. L. 2008. Fifteen years after Wingspread-environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicological Sciences*. 105 (2). 235-259.

Hsu, P. C., Huang, W., Yao, W. J. et al. 2003. Sperm changes in men exposed to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Journal of the American Medical Association*. 289. 2943-2944.

Huang, A., Powell, D., Chou, K. 1998. Pre- and postnatal exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl: 1. Effects on breeding ability and sperm fertilizing ability in male mice. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 34 (2). 204-208.

Huang, Y. Q., Wong, C. K., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlstrom, B., Neretin, L., Wong, M. H. 2012. Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*. 42. 91-99.

Hulak, M., Gazo, I., Shaliutina, A., Linhartova, P. 2013. In vitro effects of bisphenol A on the quality parameters, oxidative stress, DNA integrity and adenosine triphosphate content in strelet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 158 (2). 64-71.

Hunt, P. A., Koehler, K. E., Susiarjo, M., Hodges, C. A., Ilagan, A., Voigt, R. C., Thomas, S., Thomas, B. F., Hassold, T. J. 2003. Bisphenol A exposure causes domestic aneuploidy in the fiala mouse. *Current Biology*. 13 (7). 546-553.

Jacobs, M. N., Marczylo, E. L., Guerrero-Bosagna, C., Rüegg, J. 2017. Marked for Life: Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals. *Annual Review of Environment and Resources*. 42. 105-160.

Jacobson, J. L., Jacobson, S. W., Humphrey, H. E. B. 1990. Effect of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in your children. *Journal of Pediatrics*. 116. 38-45.

Jeng, Y. J. and Watson, C. S. 2011. Combinations of physiologic estrogens with xenoestrogens alter ERK phosphorylation profiles in rat pituitary cells. *Environmental Health Perspectives*. 119 (1). 104-112.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., Choi, K. 2013. Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental Science and Technology*. 47 (15). 8793-8800.

Kalb, A. C., Kalb, A. L., Cardoso, T. F., Fernandes, C. G., Corcini, C. D., Varel Jr., A. S., Martinez, P. E. 2016. Maternal Transfer of Bisphenol A During Nursing Causes Sperm Impairment in Male Offspring. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 70. 793-801.

Kaur, S., Saluja, M., Bansal, M. P. 2017. Bisphenol A induced oxidative stress and apoptosis in mice testes: Modulation by selenium. *Andrologia*. 2018;50:e12834. také dostupné z: < <https://doi.org/10.1111/and.12834>>.

Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott G., Sheeham, D. M., Sinks, T., et Tilson, H.A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U. S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspective Supplement*. 104 (4). 714-740.

Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinho, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S. 2005. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *The Journal of Toxicological Sciences*. 84 (2). 249-259.

Kittnar, O., Jandová, K., Kurišćák, E., Langmaier, M., Marešová, D., Mlček, M., Mysliveček, J., Pokorný, J., Riljak, V., Trojan, S. 2011. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing, a. s. Praha. 800s. ISBN: 978-80-247-3068-4.

Kolšek, K., Mavri, J., Sollner Dolenc, M. 2012. Reactivity of bisphenol A-3,4-quinone with DNA. A quantum chemical study. *Toxicology in Vitro*. 26 (1). 102-106.

Kolšek, K., Dolenc, M. S., Mavri, J. 2013. Computation study of the reactivity of bisphenol A-3,4-quinone with deoxyadenosine and glutathione. *Chemical Research in Toxicology*. 26 (1). 106-111.

Kornberg, R. D. and Lorch, Y. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of eukaryote chromosome. *Cell*. 98 (3). 285-294.

Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R., Miyakoshi, T., Shiozawa, T., Terao, Y. 2005. Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 19 (1). 121-130.

Li, Y., Duan, F., Yang, F., Zhou, X., Pan, H., Li, Y., Li, R. 2015. Pubertal exposure to bisphenol A affects the reproduction of male mice and sex ratio of offspring. *Journal of Reproduction and Contraception*. 26(1). 14-21.

Liang, Wen-jun., Zhao, B., Zhao, Pei-hua, Zhang, Cong-yun., Lie, Ya-quig. 2017. Bisphenol-S bridged penta(anilino)cyclotriphosphazene and its application in epoxy resins: Synthesis, thermal degradation, and flame retardancy. *Polymer Degradation and Stability*. 135. 140-151.

Liao, C. Y. and Kannan, K. 2013. Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (19). 4655-4662.

Liao, C., Kannan, K. 2014. A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China. *Food additives & contaminants. Part A. Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 31 (2). 319-329.

Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V. D., Mohd, M. A., Moon, H. B., Nakata, H., Kannan, K. 2012a. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environmental Science Toxicology*. 46 (12). 6860-6866.

Liao, C. Y., Liu, F., Guo, Y., Moon, H. B., Nakata, H., Wu, Q., Kannan, K. 2012b. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environmental Science Technology*. 46 (16). 9138-9145.

Liao, C., Liu, F., Kannan, K. 2012c. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residue. *Environmental Science Toxicology*. 46 (24). 6515-6522.

Liao, C. Y., Liu, F., Moon, H. B., Yamashita, N, Yunm S. H., Kannan, K. 2012d. Bisphenol analogues in sediments from industrialized areas in the United States, Japan and Korea: spatial and temporal distributions. *Environmental Science Technology*. 46 (21). 11558-11565.

Machtiger, R., Orvieto, R. 2014. Bisphenol A, oocyte maturation, implantation, and IVF outcome: review of animal and human data. *Reproductive BioMedicine Online*. 29 (4). 404410.

Maffini, M. V., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., Soto, A. M. 2006. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 254. 179-186.

Malaingaiyah, S., Hauser, R., Patterson Jr, D. G., Woudneh, M., Racowsky, C. 2012. Bisphenol A is not detectable in media or selected contact materials used in IVF. *Reproductive BioMedicine Online*. 25 (6). 608-611.

Marczylo, E. L., Jacobs, M. N., Gant, T. W. 2016. Environmentally induced epigenetic toxicity: potential public health concerns. *Critical Reviews in Toxicology*. 46 (8). 676-700.

Marmugi, A., Ducheix. S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P. G. P., Mselli-Lakhal, L. 2012. Low Dose of Bisphenol A Induce Gene Expression Related to Lipid Synthesis and Trigger Triglyceride Accumulation in Adult Mouse Liver. *Hepatology*. 55 (2). 395-407.

Mathew, M., Sreedhanya, S., Manoj, P., Aravindakumar, C. T., Aravind, U. K. 2014. Exploring the interaction of bisphenol-S with serum albumins: a better or worse alternative for bisphenol A?. *The Journal of Physical Chemistry B*. 118 (14). 3832-3843.

McGowan, P. O. and Szyf, M. 2010. Environmental epigenomics: understanding the effects of parental care on the epigenome. *Essays in Biochemistry*. 48 (1). 275-287.

Meeker, J. D., Ehrlich, S., Toth, T. L., Wright, D. L., Calafat, A. M., Trisini, A. T., Ye, X., Hauser, R. 2010. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility. *Reproductive Toxicology*. 30 (4). 532-539.

Molina-Molina, J. M., Amaya, E., Grimaldi, M., Saenz, J. M., Real, M., Fernandez, M. F., Balaguer, P., Olea, N. 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 272 (1). 127-136.

Naderi, M., Wong, M. Y., Gholami, F. 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic toxicology*. 148. 195-203.

NIEHS. National Institute of Environmental Health Sciences. U. S. Department of Health and Human Services [online]. Research Triangle Park. NC 27709. May 2010. [cit. 2015-24-11] Dostupné z: <[http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine\\_disruptors\\_508.pdf](http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf)>.

Newbold, R. R., Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E. 2009. Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environmental Health Perspectives*. 117 (6). 879-885.

Pacchierotti, F., Randaldi, R., Eichenlaub-Ritter, U., Attia, S., Adler, I. D. 2008. Evaluation of aneugenic effects of bisphenol A in static and germ cells of the mouse. *Mutation Research*. 651. 64-70.

Peretz, J., Craig, Z. R., Flaws, J. A. 2012. Bisphenol A inhibits follicle growth and induces atresia in cultured mouse antral follicles independently of the genomic estrogenic pathway. *Biology of Reproduction*. 87 (3). 1-11.

Peretz, J., Vrooman, L., Rieke, W. A., Hunt, P. A., Ehrlich, S., Hauser, R., Padmanabhan, V., Taylor, H. S., Swan, S. H., VandeVoort, C. A., Flaws, J. A. 2014. Bisphenol A and reproductive health: Update of experimental and human evidence, 2007-2013. *Environmental Health Perspectives*. 122 (8). 775-786.

Petersen, R. E., Theobald, H. M., Kimmel, G. L. 1993. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross species comparisons. *Critical Review in Toxicology*. 23 (3). 283-335.

Qiu, W., Zhao, Y., Yang, M., Farajzadeh, M., Pan, Ch., Wayne, N. L. 2016. Action of Bisphenol A and Bisphenol S on the Reproductive Neuroendocrine system During Early Developmental in Zebrafish. *Endocrinology*. 157 (2). 636-647.

Rahman, M. S., Kwon, W.-S., Lee, J.-S., Yoon, A.-J., Ryu, B.-Y., Pang, M.-G. 2015. Bisphenol A Affects Male Fertility via Fertility-related Proteins in Spermatozoa. *Scientific Repost*. 5. 9169.

Rajasarkka, J., Koponem, J., Airaksinen, R., Kiviranta, H., Virta, M. 2014. Monitoring bisphenol A and estrogenic chemicals in thermal paper with yeast-based bioreporter assay. *Analytical and Bioanalytical chemistry*. 406 (23). 5695-5702.

Rochester, J. R. 2013. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*. 42. 132-155.

Rochester, J. R., Bolden, A. L. 2015. Bisphenol S and F: systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental Health Perspectives*. 123 (7). 643-650.

Rosenmai, A. K., Dybdahl, M., Pedersen, M., van Vugt-Lussenburg, B. M., Weedebye, E. B., Taxvig, C., et al. 2014. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives?. *Toxicological Sciences*. 139. 35-47.

Shi, M., Sekulovski, N., MacLean II, J. A., Hayashi, K. 2017. Effects of bisphenol A analogues on reproductive functions in mice. *Reproductive Toxicology*. 31 (4). 358-369.

Shrape, R. M., Skakkebaek, N. E. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm count and disorders of the male reproductive tract? *The Lancet*. 341(8857). 1392-1395.

Smits-van Prooije, A. E., Waalkens-Berendsen, D. H., Morse, D. C., et al. 1996. The effects on mammals of pre- and postnatal environmental exposure PCBS. The dutch Collaborative PCA/Dioxin Study. *Archives of Toxicology Supplement*. 18. 97-102.

Stoll, R., Ichas, F., Fauconau, N., Maraud, R. 1993. Action of estradiol and tamoxifen on the Mullero-regressive activity of the Chin embryonic testis assayed in vivo by organotypic rafting. *Antal Embryology*. 187. 379-384.

Sumpter, J.P., et. Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspective Supplement* 103 (7). 173-178.

Susiarjo, M., Sasson, I., Mesaros, C., Bartolomei, M. S. 2013. Bisphenol A exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLOS Genetics*. 9 (4). e1003401.

Takao, T., Nanamiya, W., Nagano, I., Asaba, K., Kawabata, K., Hashimoto, K. 1999. Exposure with the environmental estrogen bisphenol A disrupts the male reproductive tract in young mice. *Life sciences*. 65 (22). 2351-2357.

Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J. 2013. Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interaction Journal*. 203 (3). 556-564.

Tian, J., Ding, Y., She, R., Ma, L., Du, F., Xia, K., Chen, L. 2017. Histologic study of testis injury after bisphenol A exposure in mice: Direct evidence for impairment of the genital system by endocrine disruptors. *Toxicology and Industrial Health*. 33 (1). 36-45.

Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J. 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*. 104(4). 741-803.



Toyama, Y., Yuasa, S. 2003. Effects of neonatal administration of 17 $\beta$  estradiol,  $\beta$ -estradiol 3benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermiogenesis. *Reproductive Toxicology*. 19. 1181-188.

Ullah, H., Jahan, S., Ain, Q. U., Shaheen, G., Ahsan, N. 2016. Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study. *Chemosphere*. 152. 383-391.

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R. Jr., Lee, D. H. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and non-monotonic dose responses. *Endocrine Reviews*. 33 (3). 378-455.

Vandenberg, L. N. 2014. Nonmonotonic dose response in studies endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose Response*. 12. 259-276.

Vilela, J., Hartmann, A., Silva, E. F., Cardoso, T., Corcini, C. D., Varela-Junior, A. S., Martinez, P. E., Colares, E. P. 2013. Sperm impairments in adult vesper mice (*Calomys laucha*) caused by in utero exposure to bisphenol A. *Andrologia*. 46 (9). 971-978.

Vinas, P., Campillo, N., Martinez-Castillo, N., Hernandez-Cordoba, M. 2010. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and bisphenol migrated from food cans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397 (1). 115-125.

Viñas, R. and Watson, Ch. S. 2013. Bisphenol A Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effect on Cell Functions. *Environmental Health Perspectives*. 121 (3). 352- 358.

Vom-Saal, F., Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Palanza, P., Thayer, K. T., Nagel, S. C., Parmigiani, S., Welshons, W. V. 1998. 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. *Toxicology and Industrial Health*. 14. 239-260.

Wang, H.-F., Liu, M., Li, N., Luo, T., Zheng, L.-P., Zeng, X.-H. 2016. Bisphenol A Impairs Mature Sperm Functions by a CatSper-Relevant Mechanism. *Society of Toxicology*. 152(1). 145-154.

Wang, Q., Zhao, X.-F., Ji, Y.-L., Wang, H., Liu, P., Zhang, Ch., Zhang, Y., Xu, D.-X. 2010. Mitochondrial signaling pathway is also involved in bisphenol A induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicology Letters*. 199. 129-135.

Wang, W., Abualnaja, K. O., Asimakopoulos, A. G., Covaci, A., Gevao, B., Johnson-Restrepo, B., Kumosani, T. A., Malarvannan, G., Minh, T. B., Moon, H. B., Nakata, H., Sinha, R. K., Kannan, K. 2015. A comparative assessment of human exposure to tetrabromobisphenol A and eight bisphenols including bisphenol A via indoor dust ingestion in twelve countries. *Environmental International*. 83. 183-191.

Wan, X., Ru, Y., Chu, Ch., Ni, Z., Zhou, Y., Wang, S., Zhou, Z., Zhang, Y. 2016. Bisphenol A accelerates capacitation associated protein tyrosine phosphorylation of rat sperm by activating protein kinase A. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*. 48 (6). 573-580.

Welshons, W. V., Nagel, S. C., vom Saal, F. S. 2006. Large effects from small exposure. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 147 (6). 56-69.

WHO. 2009. Bisphenol A (BPA)-Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO. INFOSAN. Online. Dostupné z: <  
[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/No\\_05\\_Bisphenol\\_A\\_Nov09\\_en.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_en.pdf)>

Wright, C., Milne, S., Leeson, H. 2014. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility, *Reproductive BioMedicine online* 28 (6). 684-703.

Wu, L. H., Zhang, X. M., Wang, F., Gao, Ch. J., Chen, D., Palumbo, J. R., Guo, Y., Zeng, E. Y. 2018. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *Science of the Total Environment*. 615. 87-98.

Xue, J., Wan, Y., Kannan, K. 2016. Occurrence of bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers (BADGEs), and novolac glycidyl ethers (NOGEs) in indoor air from ALbany, New York, USA, and its implications for inhalation exposure. *Chemosphere*. 151. 1-8.

Xue, J., Wu, Q., Sakthivel, S., Pavithran, P. V., Vasukutty, J. R., Kannan, K. 2015. Urinary levels of endocrine – disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens, and triclosan in obese and non-obese Indian children. *Environmental Reseaech*. 137. 120-128.

Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., Yakabe, Y. 2004. Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor – binding affinity. *Toxicology Letters*. 146 (2). 111-120.

Yamazaki, E., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, J., Lam, P. K. S., moon, H.-B., et al. 2015. Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 122. 565-572.

Yang, Y., Lu, L., Zhang, J., Yang, Y., Wu, Y., Shao, B. 2014. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and soild samples by liquid chromatography-electrospray tandem mess spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1328. 26-34.

Zala, S. M., Penn, D. J. 2004. Abnormal Behaviours indult by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. *Animal Behavior*. 68 (4). 649-664.

Žalmanová, T., Hošková, K., Nevorál, J., Adámková, J., Kott, T., Šulc, M., Kotíková, Z., Prokešová, Š., Jílek, F., Králíčková, M., Petr, J. 2017. Bisphenol S negatively affects the meiotic maturation of pig oocytes. *Scientific repost*. 7. 485.

Žalmanová, T., Hošková, K., Nevoral, J., Prokešová, Š., Zámotná, K., Kott, T., Petr, J.  
2016. Bosphinol S instead of bisphenol A: a story of reproductive disruption by regrettable  
substitution – a review. *Czech Journal of Animal Sciences*. 10. 433-449.

## 10 Seznam použitých zkratek

AhR= aryl hydrokarbonové receptory

BPA= bisphenol A= bisfenol A

BPAQ= bisphenol A- 3,4- quinoe

BPF= bisphenol F= bisfenol F

BPS= bisphenol S= bisfenol S

CAT= catalase= kataláza

DDT= dichlordifenyiltrichloretan

DES= diethylstilbestrol

DFI= DNA fragmentacion index= index fragmentace DNA

dsDNA= double strand DNA= dvouvláknová molekula DNA

EDCs=endocrine disruptors compounds= endokrinní disruptory

EE2= ethinylestradiol

EFSA= European Food Safety Authority

ERK= extracelulární kináza

E2= estradiol

FSH= folikulostimulační hormon

GnRH= Gonadotropin releasing hormon

JNK= c-Jun N-terminální kináza

LH= luteinizační hodmon

LPO= Lipid Peroxidation= lipoperoxidace

PI= propidium iodid= propidium jodid

PNA= peanut agglutinin= lektin

POD= peroxidase= peroxidáza

ROS= Reactive Oxygen Species= reaktivní kyslíkové radikály

SCSA= Sperm Chromazin Structure Assay= struktura chromatinu spermií

SOD= superoxide dismutase= superoxid dismutáza

ssDNA= single strand DNA= jednovláknová molekula DNA

TBT= tributyltin

TDI= Tolerable Daily Intake=tolerovatelný denní příjem

TNE= Tris+NaCl+EDTA

## 11 Seznam příloh

- **Příloha č.1:** Obrázek č. 1: chemická struktura Bisfenolu A, Bisfenolu S a Bisfenolu F. Rochester, J. R., Bolden, A. L. 2015. Bisphenol S and F: systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. Environmental Health Perspectives. 123 (7). 643-650.
- **Příloha č. 2:** Statisticky významné rozdíly ve hmotnosti samců mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Vyhodnocené pomocí Fisherova, LSD, testu.

		Hmotnost myší (Fisherův, LSD test)			
Č. buňky	Group	{1}	{2}	{3}	{4}
		41,818	42,439	45,244	41,305
1	VC		0,651948	0,016795	0,701145
2	BPS1	0,651948		0,057913	0,421707
3	BPS2	0,016795	0,057913		0,007764
4	BPS3	0,701145	0,421707	0,007764	

- **Příloha č. 3:** Statisticky významné rozdíly v relativní hmotnosti varlat samců mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Vyhodnocené pomocí Fisherova, LSD, testu.

		Hmotnost varlat/hmotnost těla (Fisherův test)			
Č. buňky	Group	{1}	{2}	{3}	{4}
		6,3032	6,5609	5,6053	5,6386
1	VC		0,495477	0,070543	0,076180
2	BPS1	0,495477		0,020117	0,021267
3	BPS2	0,070543	0,020117		0,931220
4	BPS3	0,076180	0,021267	0,931220	

- **Příloha č. 4:** Statisticky významné rozdíly v procentu motilních spermií mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Vyhodnocené pomocí Fisherova, LSD, testu.

Č. buňky	Motilita spermií (Fisherův test)				
	Group	{1} 63,636	{2} 33,333	{3} 62,222	{4} 58,000
1	VC		0,000093	0,838040	0,404226
2	BPS1	0,000093		0,000302	0,001241
3	BPS2	0,838040	0,000302		0,551411
4	BPS3	0,404226	0,001241	0,551411	

- **Příloha č. 5:** Statisticky významné rozdíly v procentu PNA+ buněk mezi jednotlivými experimentálními skupinami. Vyhodnocené pomocí Mann-Whitneyova testu.

Sčt. poř. BPS1	Sčt. poř. BPS2	p-hodn.	2*1 str. přesné p
111	60	0,027276	0,024434

Sčt. poř. BPS1	Sčt. poř. BPS3	p-hodn.	2*1 str. přesné p
124	66	0,006233	0,004135