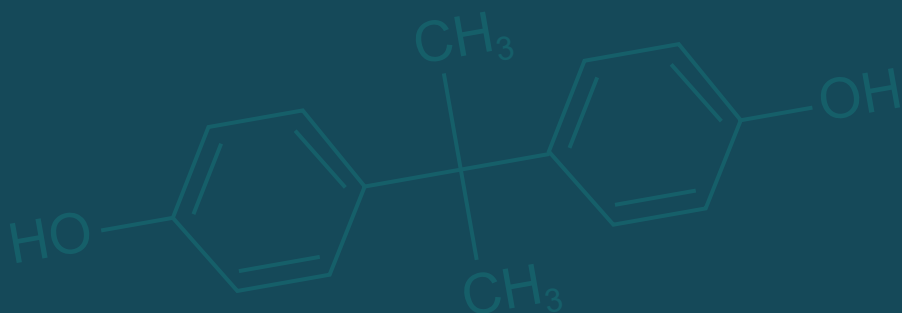


Modelový organizmus *Caenorhabditis elegans*

ako nástroj na hodnotenie
nežiaducich účinkov
endokrinných disruptorov –
bisfenolu A a jeho alternatív



Alžbeta Kaiglová
Patrícia Hockicková
Soňa Kucharíková



TRNAVA 2026

TRNAVSKÁ UNIVERZITA V TRNAVE
FAKULTA ZDRAVOTNÍCTVA A SOCIÁLNEJ PRÁCE



Autorky

doc. MVDr. Alžbeta Kaiglová, PhD. [1,84 AH]

doc. RNDr. Soňa Kucharíková, PhD. [1,84 AH]

Mgr. Patrícia Hockicková [1,84 AH]

Kontakty na autorky

Trnavská univerzita v Trnave

Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce

Katedra laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve

Univerzitné námestie 1

918 43 Trnava

e-mail: alzbeta.kaiglova@truni.sk

patricia.hockickova@tvu.sk

sona.kucharikova@truni.sk

Recenzenti:

RNDr. Lucia Bocánová, PhD.

Ústav molekulárnej biológie SAV, v. v. i.

Dúbravská cesta 21

845 51 Bratislava 45

Slovenská republika

e-mail: lucia.bocanova@savba.sk

RNDr. Zuzana Gerši, PhD.

Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

Fakulta prírodných vied

Ústav biológie a biotechnológie

Hlavná 418

919 51 Špačince

e-mail: zuzana.gersi@ucm.sk

ALŽBETA KAIGLOVÁ
PATRÍCIA HOCKICKOVÁ
SOŇA KUCHARÍKOVÁ

Modelový organizmus *Caenorhabditis elegans*

ako nástroj na hodnotenie nežiaducich účinkov
endokrinných disruptorov –
bisfenolu A a jeho alternatív



TRNAVA 2026

© doc. MVDr. Alžbeta Kaiglová, PhD.,
doc. RNDr. Soňa Kucharíková, PhD.,
Mgr. Patrícia Hockicková, 2026

ISBN 978-80-568-0984-6 (print)
ISBN 978-80-568-0972-3 (online)
DOI: 10.31262/978-80-568-0972-3/2026

Abstrakt

Predložená monografia poskytuje syntézu súčasných poznatkov o biologických účinkoch bisfenolu A (BPA) a jeho substitútov, pričom integruje výsledky relevantných vedeckých štúdií s vlastným experimentálnym výskumom autorského kolektívu. Vzhľadom na vysokú vnímavosť na environmentálny stres a dostupnosť špecifických mutantných kmeňov je v monografii vyzdvihnutá nenahraditeľná úloha *Caenorabditis elegans* ako bioindikátora pri hodnotení nežiaducich účinkov bisfenolov. V zhode s globálnymi trendmi v oblasti hodnotenia environmentálnych rizík bol náš výskum zameraný na posúdenie vplyvu týchto látok na reprodukčnú schopnosť, motorickú aktivitu a neurobehaviorálne prejavy. Kým literatúra sa často obmedzuje na nemutované organizmy, prínosom našich štúdií je využitie série mutantných kmeňov (*bli-1*, *rol-1*, *rol-6*, *sqt-1*) s poruchami kutikuly, ktoré umožnili detailnejšie objasniť vzťah medzi bariérovou funkciou povrchu tela a odpoveďou organizmu. V súlade s údajmi o nemonotónnom priebehu závislosti účinku od dávky naše výsledky potvrdili, že BPA aj jeho náhrady signifikantne narúšajú embryonálny vývin a reprodukčnú kapacitu už pri nízkych koncentráciách (0,5 – 5 μM), čo sa prejavilo zníženou liahnivosťou a redukciou telesnej dĺžky jedincov. V oblasti neurotoxicity naše dáta, v kontexte s poznatkami o neurotoxickom potenciáli bisfenolov, poukazujú na závažné narušenie procesu habituácie na mechanosenzorické stimuly a deficit v neasociatívnom učení. Najvýraznejší negatívny vplyv v našich experimentoch opakovane vykazoval bisfenol AF, ktorý vykazoval silnejší inhibičný účinok na motilitu a habituáciu než pôvodný BPA, čo pravdepodobne súvisí s jeho vyššou hydrofobicitou a väzbovou afinitou. Štúdia prináša dôkazy o tom, že prechod na „BPA-free“ alternatívy predstavuje fenomén nežiaducich náhrad („regrettable substitution“), nakoľko tieto látky vykazujú analogické, v prípade bisfenolu AF dokonca závažnejšie účinky. Získané údaje zdôrazňujú naliehavú potrebu preventívneho a detailného skríningu nových chemických substitútov pred ich masovou priemyselnou produkciou a komerčnou distribúciou.

Kľúčové slová: endokrinné disruptory, bisfenol A, bisfenol S, bisfenol F, bisfenol AF, *Caenorhabditis elegans*.

Abstract

The presented monograph provides a synthesis of current knowledge on the biological effects of bisphenol A (BPA) and its substitutes, integrating findings from relevant scientific studies with the original experimental research of the author team. Because of its high sensitivity to environmental stress and the availability of specific mutant strains, *Caenorhabditis elegans* plays an indispensable role as a bioindicator in this monograph for evaluating the adverse effects of bisphenols. In alignment with global trends in environmental risk assessment, our research examined the effects of these substances on reproductive capacity, locomotion, and neurobehavioral manifestations. While literature often limits its focus to non-mutated organisms, the contribution of our studies lies in the utilization of series of cuticle-defective mutant strains (*bli-1*, *rol-1*, *rol-6*, *sqt-1*), which allowed for a more detailed elucidation of the relationship between the body surface barrier function and the organism's response. In accordance with data on non-monotonic dose-response curves, our results confirmed that both BPA and its substitutes significantly disrupt embryonic development and reproductive capacity, even at low concentrations (0.5–5 μM), as evidenced by decreased hatchability and reduced body length. In the field of neurotoxicity, our data, in light of the known neurotoxic potential of bisphenols, point to a severe disruption of habituation to mechanosensory stimuli and a deficit in non-associative learning. In our experiments, bisphenol AF consistently exhibited the most pronounced negative impact, demonstrating a stronger inhibitory effect on motility and habituation than the original BPA, which is likely related to its higher hydrophobicity and binding affinity. The study provides evidence that transitioning to „BPA-free“ alternatives represents the phenomenon of „regrettable substitution,“ as these substances exhibit analogous or, in the case of bisphenol AF, even more severe adverse effects. The obtained data emphasize the urgent need for preventive and detailed screening of new chemical substitutes before their mass industrial production and commercial distribution.

Keywords: endocrine disruptors, bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F, bisphenol AF, *Caenorhabditis elegans*.

OBSAH

Zoznam skratiek	9
Úvod	11
1. Endokrinné disruptory (EDCs) – všeobecná charakteristika	14
1.1 Definícia a rozdelenie EDCs	14
1.2 Biologické účinky EDCs	15
1.3 Bisfenol A (BPA)	19
1.4 Substitúty BPA	22
1.4.1 Bisfenol S	23
1.4.2 Bisfenol F	25
1.4.3 Bisfenol AF	26
1.4.4 Ďalšie substitúty BPA	28
2. Modelový organizmus <i>Caenorhabditis elegans</i>	30
2.1 Biologické vlastnosti a životný cyklus	31
2.2 Využitie <i>C. elegans</i> pri štúdiu vplyvu xenobiôtik na endokrinný systém	32
2.2.1 Testy akútnej toxicity (zamerané na prežívanie nematód)	35
2.2.2 Testy rýchlosti rastu a vývinu	35
2.2.3 Test reprodukcie a sledovanie dĺžky života	36
2.2.4 Transgeneračné a multigeneračné testy	37
2.2.5 Testy neurotoxicity	38
2.2.6 Testy oxidačného stresu a poškodenia DNA	39
2.2.7 Testy apoptózy	40
2.3 <i>C. elegans</i> , objav a využitie RNA interferencie	41
3. Porovnanie biologických účinkov <i>C. elegans</i> po expozícii BPA a jeho substitútom	44
3.1 Materiál a metódy	44
3.1.1 Príprava kultivačných platní a kultivácia <i>C. elegans</i>	44
3.1.2 Príprava roztokov bisfenolov.....	45
3.1.3 Stanovenie vplyvu bisfenolov na liahnivosť	46
3.1.4 Stanovenie vplyvu bisfenolov na habituáciu na predné dotykové podnety	46

3.1.5 Stanovenie vplyvu bisfenolov na dĺžku tela <i>C. elegans</i>	47
3.1.6 Stanovenie vplyvu bisfenolov na lokomotorickú aktivitu <i>C. elegans</i>	47
3.1.7 Štatistická analýza	48
4. Výsledky	49
4.1 Výsledky liahnivosti	49
4.2 Vplyv BPA a jeho náhrad (BPS, BPF, BPAF) na návykové správanie nematód	50
4.3 Vplyv BPA a jeho náhrad (BPS, BPF, BPAF) na rast nematód	51
4.4 Sledovanie účinku BPA a jeho náhrady BPS na <i>C. elegans</i> kmeň Bristol (N2) a mutantný kmeň <i>bli-1</i>	52
4.5 Hodnotenie účinkov bisfenolov (BPA, BPS, BPF, BPAF) na <i>C. elegans</i> kmeňa WT v porovnaní s mutantnými kmeňmi <i>rol-1</i> , <i>rol-6</i> , <i>sqt-1</i>	55
4.5.1 Vplyv (BPA, BPS, BPF, BPAF) na návykové správanie <i>C. elegans</i> kmeňa WT v porovnaní s mutantnými kmeňmi <i>rol-1</i> , <i>rol-6</i> , <i>sqt-1</i>	55
4.5.2 Vplyv bisfenolov (BPA, BPS, BPF, BPAF) na frekvenciu ohybov tela <i>C. elegans</i> kmeňa WT v porovnaní s mutantnými kmeňmi <i>rol-1</i> , <i>rol-6</i> , <i>sqt-1</i>	58
4.5.3 Vplyv bisfenolov (BPA, BPS, BPF, BPAF) na liahnivosť <i>C. elegans</i> kmeňa WT v porovnaní s mutantnými kmeňmi <i>rol-1</i> , <i>rol-6</i> , <i>sqt-1</i>	61
5. Diskusia	64
Záver	72
Referencie	73

ZOZNAM SKRATIEK

AR	androgénový receptor
BPA	bisfenol A
BPBP	bisfenol BP
BPC2	bisfenol C2
BPAF	bisfenol AF
BAP	bisfenol AP
BPE	bisfenol E
BPF	bisfenol F
BPG	bisfenol G
BPP	bisfenol P
BPS	bisfenol S
BPPH	bisfenol PH
BPS-MPE	bisfenol S 4-benzyléter
BP-TMC	bisfenol TMC
BPZ	bisfenol Z
cAMP/PKA	cyklický adenosínmonofosfát/proteínkináza K
<i>C. elegans</i>	hlístovec <i>Caenorhabditis elegans</i>
-CH ₃ -	metylová skupina
DBP	dibutylftalát
DDT	dichlórdifenyltrichlóretán
DEHP	dietylhexylftalát
DES	dietylstilbestrol
ECDs	endokrinné disruptory
EEA	Európska agentúra pre životné prostredie
EE2	etinylestradiol
EFSA	Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (angl. <i>European Food Safety Authority</i>)
ECHA	Európska chemická agentúra (angl. <i>European Chemical Agency</i>)
EPA	Americká agentúra na ochranu životného prostredia (angl. <i>U.S. Environmental Protection Agency</i>)
ER	estrogénový receptor
EER	receptor príbuzný estrogénu
FSH	folikuly stimulujúci hormón
GFP reportér	reportérový gén/proteín fúzovaný so zeleným fluorescenčným proteínom (angl. <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GRa	glukokortikoidové receptory a
HRE	elementy hormonálnej odpovede (angl. <i>Hormone Response Elements</i>)

IGF	inzulínu podobný rastový faktor (angl. <i>Insulin-like Growth Factor</i>)
IPCS	Medzinárodný program pre chemickú bezpečnosť (angl. <i>International Programme on Chemical Safety</i>)
KH_2PO_4	dihydrogénfosforečnan draselný
K_2HPO_4	hydrogénfosforečnan didraselný
L1 – L4	označenie štyroch larválnych štádií
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu horečnatého
mRNA	messengerová RNA
miRNA	mikroRNA
NaCl	chlorid sodný
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát hydrogénfosforečnanu sodného
NaOH	hydroxid sodný
NGM	rastové médium pre nematódy (angl. <i>Nematode growth medium</i>)
PBDE	polybromované difenylétery
PCB	polychlórované bifenylly
PPAR	peroxizómový proliferátorom aktivovaný receptor
PR	progesterónový receptor
REACH	Nariadenie o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (angl. <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>)
RNAi	RNA interferencia
RXR	retinoidový x receptor
siRNA	krátke interferujúce RNA (z angl. <i>small interfering RNA</i>)
-SO ₂ -	sulfonylová skupina
SVHC	látka vzbudzujúca vysoké obavy (z angl. <i>Substance of Very High Concern</i>)
qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (angl. <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
T3	hormón štítnej žľazy, trijodtyronín
T4	hormón štítnej žľazy, tetrajodtyronín (tyroxín)
TBG	tyroxín viažúci globulín, tyreoglobulín (angl. <i>Thyroxine-Binding Globulin</i>)
TBBPA	tetrabrómbisfenol A
TCBPA	tetrachlórbisfenol A
TDI	tolerovateľný denný príjem (z angl. <i>Tolerable Daily Intake</i>)
TTR	transtretín (proteín prenášajúci hormóny štítnej žľazy)
TR	tyroidný receptor (receptor pre hormóny štítnej žľazy)
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia (angl. <i>World Health Organization</i>)
WT	nemutovaný kmeň <i>C. elegans</i> var. Bristol (N2, „wild type“)

ÚVOD

V posledných desaťročiach sa svetová výroba plastov dramaticky zvýšila, čo viedlo k masívnemu nárastu množstva syntetických chemických látok prítomných v životnom prostredí. Mnohé z týchto zlúčenín sa vďaka svojej štruktúre a biologickej aktivite správajú ako endokrinné disruptory – exogénne látky schopné narušiť hormonálnu homeostázu organizmov (WHO/IPCS, 2002, Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Endokrinné disruptory zasahujú do syntézy, transportu, metabolizmu či receptorového pôsobenia prirodzených hormónov, a tým menia základné fyziologické procesy, ktoré sú nevyhnutné pre rast, vývin, reprodukciu a udržiavanie vnútornej rovnováhy (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009, La Merrill *et al.*, 2020, Anne a Raphael, 2021). Ich prítomnosť v životnom prostredí je dôsledkom ľudskej činnosti a predstavuje rastúci globálny problém s významnými dopadmi na ekosystémy aj zdravie ľudskej populácie.

K jednému najrozšírenejších endokrinných disruptorov patrí bisfenol A (BPA), ktorý sa používa predovšetkým pri výrobe polykarbonátových plastov, epoxidových živíc a ďalších polymérov s vysokou pevnosťou a odolnosťou. BPA sa nachádza v bežných produktoch každodennej potreby – od potravinových obalov, termopapiera a nápojových fliaš až po zdravotnícke pomôcky a elektroniku. Jeho schopnosť viazať sa na hormonálne receptory, najmä estrogénové a androgénne, z neho robí látku s významným endokrinným potenciálom. Výskumy z posledných rokov potvrdzujú, že sa podieľa na rozvoji metabolických porúch, reprodukčných dysfunkcií, zmien správania, ako aj na zvýšenom riziku vzniku vybraných typov nádorov (Ullah *et al.*, 2018, Akash *et al.*, 2020, Costa a Cairrao, 2024, Lü *et al.*, 2024, Lindt *et al.*, 2025, Shi *et al.*, 2025). Okrem toho pretrváva vo vodných a pôdnych ekosystémoch, odkiaľ môže prenikať do potravinového reťazca a kumulovať sa v organizmoch (Guo *et al.*, 2017, Torres-García *et al.*, 2022).

Regulačné opatrenia v Európskej únii aj v iných regiónoch sveta preto viedli k postupnému obmedzovaniu používania BPA, najmä v produktoch pre deti a v potravinových obaloch. Tlak na jeho náhradu však spôsobil intenzívny rozvoj výroby chemicky podobných zlúčenín, ako sú bisfenol S (BPS), bisfenol P (BPP), bisfenol AP (BAP), bisfenol Z (BPZ) bisfenol F (BPF), či bisfenol AF (BPAF). Tieto analógy boli dlho považované za bezpečnejšie alternatívy, no dôkazy z nedávnych experimentálnych a epidemiologických štúdií naznačujú, že môžu vykazovať podobné alebo dokonca silnejšie nežiaduce účinky (Ro-

chester a Bolden, 2015, Žalmanová *et al.*, 2017, Martínez *et al.*, 2020, Reininger a Oehlmann, 2024, Lin *et al.*, 2025). Výskyt jednej z najčastejšie používaných náhrad BPA – BPS – bol potvrdený v krvi, moči, materskom mlieku aj v zložkách životného prostredia, a to v koncentráciách prevyšujúcich pôvodné odhady (Jialin, 2024; Lin *et al.*, 2025). Štúdie dokumentujú, že BPS (podobne ako BPA) vykazuje negatívne účinky na endokrinný a reprodukčný systém a prispieva k vývinovej toxicite (Mersha *et al.*, 2015, Xiao *et al.*, 2019). Konkrétne *in vivo* experimenty naznačujú, že už nízke koncentrácie BPS narušajú vývin zárodočných buniek (Nevoral *et al.*, 2018), pričom najnovšie zistenia spájajú túto látku aj s patogenézou nevysvetliteľných opakovaných potratov (Liang *et al.*, 2020). Podobné riziká predstavujú aj analógy BPF a BPAF, ktoré vykazujú afinitu k hormonálnym receptorom, ovplyvňujú génovú expresiu a indukujú oxidačný stres (Mokra *et al.*, 2019; Shamhari *et al.*, 2021). Nedostatočná regulácia a rýchle rozširovanie týchto látok na trhu tak vedie k fenoménu tzv. nežiaducich náhrad („*regrettable substitution*“), kedy je jedna nebezpečná látka nahrádzaná inou s podobne rizikovým profilom.

V súvislosti s rastúcimi obavami odborníkov aj verejnosti sa čoraz intenzívnejšie diskutuje potreba využívania modelových organizmov na hodnotenie nežiaducich účinkov endokrinných disruptorov. Jedným z najcennejších a najflexibilnejších modelov je nematóda *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), ktorá predstavuje ideálny systém na štúdium účinkov chemikálií na úrovni bunky, tkaniva aj celého organizmu. *C. elegans* má jednoduchú anatomickú stavbu, úplne zmapovanú nervovú sústavu a dobre charakterizovaný genóm, pričom jeho signalizačné dráhy, zodpovedné za reguláciu stresovej odpovede, metabolizmu, reprodukcie a neurobehaviorálnych procesov sú evolučne konzervované (Brenner, 1974, Baumeister *et al.*, 2006). Krátky životný cyklus nematód umožňuje rýchle generovanie dát o akútnych aj chronických účinkoch chemických látok vrátane sledovania prejavov nežiaducich účinkov naprieč viacerými generáciami. Ďalšou významnou výhodou *C. elegans* je, že mnohé biologické procesy ovplyvňované endokrinnými disruptormi u cicavcov sú prítomné aj v tomto jednoduchom organizme. Hoci nemá špecializované endokrinné žľazy ako vyššie živočíchy, disponuje niektorými hormonálnymi/signalizačnými dráhami (napr. inzulín/IGF), ktoré regulujú metabolizmus, stresovú odpoveď či životnosť (Hashmi *et al.*, 2013, Moreno-Ariola *et al.*, 2014). *C. elegans* je preto vhodným modelom na detekciu zmien vo vývine, správaní, metabolizme, raste či reprodukcii vyvolaných vystavením chemickým látkam s hormonálnou aktivitou (Mersha *et al.*, 2015, Hunt, 2016, García-Espiñeira *et al.*, 2018, Rodrigues *et al.*, 2024, Kucharíková *et al.*, 2023, Wang *et al.*, 2023, Kaiglová *et al.*, 2025).

Nedávne štúdie ukázali, že expozícia BPA a jeho alternatívam vedie u *C. elegans* k narušeniu viacerých životne dôležitých procesov – od zníženej

liahnivosti embryí, cez poruchy rastu a zvýšený oxidačný stres, až po zmeny v habituácii, ktorá je jedným z najjednoduchších a najcitlivejších prejavov učenia (Mersha *et al.*, 2015; Kucharíková *et al.*, 2023, Kaiglová *et al.*, 2025). Tieto výsledky jednoznačne naznačujú, že aj nízke koncentrácie bisfenolov môžu významne ovplyvniť biologické funkcie, ktoré sú zásadné pre udržanie životného cyklu organizmu. Preto je nevyhnutné detailne preskúmať účinky BPA a jeho náhrad a identifikovať možné rozdiely aj podobnosti v ich biologickom pôsobení. *C. elegans* predstavuje model, ktorý umožňuje hodnotiť mieru nebezpečnosti bisfenolov rýchlo, efektívne a eticky prijateľným spôsobom (Maxwell *et al.*, 2008).

Cieľom tejto monografie, určenej vedeckým pracovníkom a doktorandom zaoberajúcim sa environmentálnym výskumom je nielen poskytnúť ucelený prehľad o biologických účinkoch BPA a jeho štrukturálnych analógov, ale najmä poukázať na riziká spojené s týmito substitútmi. Hoci sú v súčasnosti považované za bezpečnejšie alternatívy, monografia upozorňuje na ich možné nežiaduce účinky a prispieva tak k hlbšiemu pochopeniu ich potenciálnych zdravotných rizík pre človeka a životné prostredie. Práca zároveň predstavuje možnosti sledovania účinkov týchto látok s využitím modelového organizmu *C. elegans*.

1. ENDOKRINNÉ DISRUPTORY (EDCS) – VŠEOBECNÁ CHARAKTERISTIKA

Endokrinné disruptory (z angl. *Endocrine Disrupting Chemicals* – EDCs) sú heterogénna skupina exogénnych chemických látok alebo ich zmesí, ktoré môžu narušiť komplexný regulačný endokrinný systém. Endokrinný systém je tvorený sústavou žliaz, ktoré produkujú hormóny, chemické signálne molekuly, sprostredkujúce interakcie so špecifickými cieľovými štruktúrami, ako sú receptory. Tieto interakcie regulujú široké spektrum fyziologických procesov vrátane rastu, vývinu, reprodukcie, energetickej homeostázy, metabolizmu a udržiavania telesnej hmotnosti (Jameson, 2016). Regulácia hormonálnych procesov v organizme je mimoriadne citlivá na rôzne vnútorné aj vonkajšie podnety, pričom jednou z významných skupín environmentálnych faktorov, ktoré ju môžu narušiť, sú EDCs.

1.1 Definícia a rozdelenie EDCs

Napriek drobným formulačným rozdielom sa definície, ktoré zaviedli Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) a Medzinárodný program pre chemickú bezpečnosť (IPCS) v roku 2002, Americká agentúra na ochranu životného prostredia (EPA) a Európska environmentálna agentúra (EEA), zhodujú v tom, že EDCs sú exogénne látky (jednotlivé zlúčeniny alebo ich zmesi) ktoré narušajú funkciu endokrinného systému. Konkrétne zasahujú do syntézy, sekrécie, transportu, väzby, pôsobenia alebo eliminácie hormónov. Hlavným dôsledkom tejto interferencie je vznik nepriaznivých zdravotných účinkov u exponovaného organizmu, jeho potomstva alebo v celej populácii. Tieto látky, ovplyvňujúce hormonálnu rovnováhu, môžu ohrozovať kľúčové procesy, ako sú homeostáza, reprodukcia či vývin organizmu (WHO/IPCS, 2002, EPA, 1998, EEA, 1996).

EDCs sa podľa chemickej štruktúry a pôvodu delia do niekoľkých primárnych kategórií. Pesticídy a herbicídy tvoria rozsiahlu skupinu, kam patria látky ako perzistentné organické polutanty (POPs), napríklad DDT (dichlórdifenyiltrichlóretán) a jeho metabolity, či fungicídy ako vinclozolín alebo herbicíd atrazín (Hayes *et al.*, 2010, Mnif *et al.*, 2011). K ďalšej skupine EDCs patria priemyselné chemikálie, ktoré sú prítomné v širokej škále spotrebných produktov a predstavujú jeden z najčastejších zdrojov expozície. Medzi kľúčové príklady

patria: BPA, používaný pri syntéze polykarbonátových plastov a epoxidových živíc; ftaláty (napr. dietylhexylftalát – DEHP, dibutylftalát – DBP), ktoré slúžia ako zmäkčovadlá plastov; polychlórované bifenyly (PCB) a polybromované difenylétery (PBDE), používané ako spomaľovače horenia. Tieto látky sa uvoľňujú z plastových obalov, stavebných materiálov a domáceho prachu. Nezanedbateľná je aj prítomnosť farmaceutík (napr. syntetických estrogénov ako etinylestradiol – EE2) a ich metabolitov v odpadových vodách, čo predstavuje hrozbu najmä pre vodné ekosystémy (Klaic *et al.*, 2022). Napokon, k EDCs sú zaradované aj niektoré prírodné látky ako fytoestrogény (genisteín, daidzeín) obsiahnuté v rastlinnej strave, či mykotoxíny ako zearalenón, ktoré môžu vykazovať mierne estrogénne účinky (Hueza *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2022, Xiang *et al.*, 2023). Kombinácie týchto látok (napr. zearalenón s genisteínom) môžu viesť k synergickým účinkom, čím sa celková estrogénna odpoveď výrazne zvyšuje (Vejdovszky *et al.*, 2017). Okrem týchto dobre známych organických chemikálií je dnes čoraz viac dôkazov, že aj ťažké kovy môžu fungovať ako EDCs. Medzi najčastejšie spomínané patria napríklad kadmium (Cd), olovo (Pb), ortuť (Hg), arzén (As), nikel (Ni), meď (Cu) či zinok (Zn) (Liu *et al.*, 2023a). U týchto kovov bolo dokázané, že vykazujú vlastnosti endokrinných disruptorov, ktoré interferujú s hormonálnou signalizáciou. Ich účinok spočíva v priamej kompetitívnej väzbe na špecifické hormonálne receptory, čím modulujú transkripčnú aktivitu génov kľúčových pre udržanie endokrinné homeostázy. Zároveň negatívne ovplyvňujú enzymatické dráhy zapojené do biosyntézy a degradácie hormónov (Liu *et al.*, 2023a, Yang Z., 2024).

1.2 Biologické účinky EDCs

Dôležitou vlastnosťou EDCs je ich schopnosť vyvolávať biologické účinky v živých organizmoch už pri veľmi nízkych koncentráciách. Prejavujú tak netradičnú „dose-response“ dynamiku, keďže pôsobia podobne ako hormóny a neurotransmitery pri koncentráciách, ktoré by boli pri bežných toxických látkach neúčinné (Vandenberg *et al.*, 2012). Ďalším rozhodujúcim faktorom je, že negatívne dôsledky vystavenia týmto látkam sú silne závislé od času expozície. Najcitlivejšie je obdobie od prenatálnej fázy vývinu až po dospievanie, čo je čas, počas ktorého sa uskutočňuje formovanie hormonálneho systému. Expozícia nízkym hladinám EDCs v tejto kritickej, zraniteľnej fáze môže viesť k nezvratnému poškodeniu jedinca. Obzvlášť zložitá je situácia tehotných žien, pretože vystavenie EDCs v tomto období môže mať vplyv na viacero generácií súčasne: na matku, na vyvíjajúci sa plod a dokonca aj na zárodočné bunky (gaméty) plodu. Okrem toho bolo zdokumentované, že niektoré EDCs dokážu

ovplyvniť nasledujúce generácie prostredníctvom zmien v dedičných mechanizmoch, ako je napríklad epigenetická modifikácia DNA (Endocrine Society, 2023).

Ľudia sú neustále, často nevedome, vystavení rozsiahlemu spektru týchto chemických látok (Yilmaz *et al.*, 2019). Tráviaci trakt predstavuje hlavnú vstupnú bránu pre perzistentné organické látky a väčšinu ostatných EDCs, pričom odhady hovoria, že viac ako 90 % všetkých prijatých EDCs pochádza z konzumovanej potravy (Perello *et al.*, 2012, Nadal a Domingo, 2013). Expozícia inhaláciou je významná najmä pri prchavých a semivolatilných EDCs. Ich detekcia v tkanivách cicavcov v odľahlých častiach sveta naznačuje, že sa dokážu šíriť na veľké vzdialenosti vzduchom a oceánskymi prúdmi (Carpenter, 2006). Hoci sa dermálna cesta často považuje za menej významnú v porovnaní s ingesciou, pre určité skupiny látok predstavuje dôležitý spôsob vstupu do organizmu (Weschler a Nazaroff, 2014). Koža nie je nepriepustnou bariérou; mnohé EDCs sú lipofilné, čo im umožňuje relatívne ľahko prenikať cez rohovinovú vrstvu epidermis priamo do krvného obehu.

Vystavenie ľudí rôznorodým EDCs počas celého života (či už prostredníctvom spotrebných výrobkov, pracovného prostredia, liečiv, a pod.) môže významne narušiť jemnú reguláciu hormonálnych procesov v organizme. Pôsobenie EDCs sa dlhodobo spája s rizikom porúch reprodukčných (Skakkebaek, 2016, Johansson *et al.*, 2017, Axelstad *et al.*, 2018, Sifakis *et al.*, 2017) a kognitívnych funkcií (Amano *et al.*, 2018, Ghassabian a Trasande, 2018), metabolických ochorení a porúch (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010, Cano-Sancho *et al.*, 2017) ako aj rôznych typov nádorových ochorení (Giulivo *et al.*, 2016, Scsukova *et al.*, 2016). Biologické pôsobenie endokrinne disruptívnych látok je komplexné a primárne sa klasifikuje podľa hormonálnej dráhy, ktorú narušajú.

V skorších obdobiach sa predpokladalo, že EDCs uplatňujú svoje účinky najmä prostredníctvom jadrových hormonálnych receptorov, zahŕňajúc estrogénové receptory (ERs), androgénové receptory (AR), progesterónové receptory, receptory štítnej žľazy (TR), a iné (ako napr. peroxizómové proliferátorom aktivované receptory - PPAR a retinoidové x receptory - RXR). Tieto receptory sú od hormónov závislé transkripčné faktory, ktoré kontrolujú génovú expresiu, pričom napodobňujú alebo blokujú prirodzené hormóny. EDCs, ktoré sa naviažu na jadrové (nukleárne) receptory, môžu meniť normálnu funkciu buniek a viesť k nepriaznivým zdravotným účinkom. Súčasný stav poznania však jednoznačne naznačuje, že mechanizmy pôsobenia EDC sú omnoho rozmanitejšie a komplexnejšie, než sa pôvodne predpokladalo. Popri receptorových interakciách môžu ovplyvňovať aj epigenetické modifikácie v bunkách produkujúcich hormóny alebo reagujúcich na hormóny, narušovať ich syntézu, ovplyvňovať ich transport cez bunkové membrány, meniť ich distribúciu a hladiny

v cirkulácii, zasahovať do ich metabolizmu a odbúravania a dokonca meniť aj osud buniek, ktoré hormóny produkujú alebo na ne odpovedajú (La Merrill *et al.*, 2020).

Najdlhšie a najlepšie preštudovanou kategóriou sú látky pôsobiace na signalizáciu pohlavných hormónov. Estrogénne disruptory alebo xenoestrogény (napr. BPA, metoxychlór, nonylfenol) sú schopné viazať sa na estrogénové receptory ER α a ER β a aktivovať ich, čím napodobňujú účinok endogénneho 17 β -estradiolu. Antiestrogénne látky naopak väzbu blokujú. Tieto mechanizmy sú spájané so zmenami vo vývine reprodukčného systému, zvýšeným rizikom hormonálne závislých karcinómov (prsníka, prostaty) a predčasnou pubertou (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Androgénne a antiandrogénne disruptory narúšajú účinok testosterónu a dihydrotestosterónu. Antiandrogénne disruptory, kam patria niektoré ftaláty (napr. DEHP) a fungicíd vinclozolín, buď priamo blokujú AR, alebo inhibujú enzýmy nevyhnutné pre syntézu testosterónu (napr. steroidogénne enzýmy, ako je 17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza). Expozícia týmto látkam počas kritických vývinových fáz plodu je silno korelovaná s reprodukčnými abnormalitami mužov, ako sú hypospádia, kryptorchizmus a znížená kvalita spermií, čo je súčasťou syndrómu známeho ako testikulárny dysgenetický syndróm (Nordkap *et al.*, 2012, Gore *et al.*, 2015, Fénichel *et al.*, 2019).

Hormóny štítnej žľazy (tyroxín - T4, trijódtyronín - T3) sú kritické pre neurovývin. Tyroidálne disruptory (napr. PCB, PBDE, perchlorát) zasahujú do systému na viacerých úrovniach. Môžu inhibovať syntézu hormónov štítnej žľazy blokovaním jodidového transportu, alebo inhibíciou tyreoidálnej peroxidázy; ďalej narúšajú transport hormónov v krvi tým, že kompetitívne vytesňujú T4 z viažucich proteínov, ako je tyreoglobulín (TBG) a transtretín (TTR) (Calsolaro *et al.*, 2017). Tieto účinky sú spájané s neurovývinovými deficitmi a hypotyreózou, pričom najzraniteľnejšie je mozgové tkanivo počas prenatálneho vývinu (Gore *et al.*, 2015; Ghassabian a Trassande, 2018).

Rastúci záujem sa sústreďuje na EDCs, ktoré zasahujú do metabolických procesov. Tieto látky, často označované ako metabolické disruptory (napr. tributylcín, BPA a niektoré ftaláty), ovplyvňujú signalizáciu inzulínu, glukagónu a adipokínov. Ich mechanizmus často zahŕňa aktiváciu nukleárných receptorov ako je PPAR γ , ktorý reguluje adipogenézu. Expozícia týmto látkam je často asociovaná so zvýšeným rizikom obezity, inzulínovej rezistencie a diabetu 2. typu (Grün a Blumberg, 2006, Sun *et al.*, 2014, Gore *et al.*, 2015).

Mechanizmy účinku EDCs závisia od ich špecifického pôsobenia na bunkovej a tkanivovej úrovni, ako aj od cirkadiánnych rytmov, sezónnych zmien, fázy životného cyklu a pohlavia (Zoeller *et al.*, 2012). Navyše, vývinovo podmienený, cirkadiánný či pulzatilný charakter hormonálnej sekrécie predstavuje

Tab. 1: Klasifikácia EDCs podľa chemickej štruktúry, hlavných zdrojov expozície a zdravotných účinkov

Kategória	Hlavné zdroje expozície	Konkrétne príklady látok	Zdravotné účinky (vybrané)
Pesticídy a herbicídy	Poľnohospodárstvo, ošetrované potraviny, pitná voda, domáce pesticídy.	DDT (dichlórdifenyltrichlóretán), lindán, atrazín, vinclozolin, metoxychlór.	Reprodukčná toxicita (napr. znížená kvalita spermií), oneskorenie/predčasná puberta, narušenie funkcie štítnej žľazy (Diamant-Kandarakis <i>et al.</i> , 2009).
Priemyselné chemikálie	Plasty, stavebné materiály, textilie, elektronika, obaly na potraviny.	Bisfenol A (BPA), ftaláty (napr. DEHP, DBP), polychlórované bifenyly (PCB), polybromované difenylétery (PBDE – spomaľovače horenia).	Narušenie reprodukčných funkcií (antiandrogénne účinky ftalátov), karcinóm prsníka/prostаты, metabolické poruchy (obezita, diabetes), neurovývinové poruchy (Sharma <i>et al.</i> , 2020, Kumar <i>et al.</i> , 2020, Wang a Qian, 2021, Kurşunoğlu <i>et al.</i> , 2022, Ahn a Jeung, 2023).
Farmaceutiká	Zvyšky liečiv v odpadových a povrchových vodách (nepriama expozícia).	Syntetické estrogény (napr. etinylestradiol – EE2), dietylstilbestrol (DES – historický prípad).	Feminizačné účinky pri vodných organizmoch (po vystavení EE2) (Xu <i>et al.</i> 2008, Dzieweczyński a Hebert, 2013), reprodukčné vady u potomkov po expozícii žien DES (Tournaire <i>et al.</i> , 2016).
Prírodné látky (fytoestrogény a mykotoxíny)	Strukoviny (sója), obilniny (ľanové semienka), hubami kontaminované krmivá/potraviny.	Genistéin, daidzeín (izoflavóny), zearealenón (mykotoxín).	Estrogénová aktivita prostredníctvom väzby na ER. Kombinácie týchto látok (napr. zearealenón s genistéinom) môžu viesť k synergickým účinkom, čím sa celková estrogénová odpoveď výrazne zvyšuje (Vejdovsky <i>et al.</i> , 2017).
Ťažké kovy	Priemyselné emisie, ťažobný priemysel, spaľovanie fosílnych palív, kontaminovaná voda a pôda, potraviny (bioakumulácia).	Kadmium (Cd), olovo (Pb), ortuť (Hg), arzén (As), nikel (Ni), meď (Cu), zinok (Zn).	Napodobňovanie hormónov, narušenie funkcie štítnej žľazy, hypotalamo-hypofýzárnych osí, gonád a nadobličiek, neurovývinové defekty (Liu, 2023a, Yang <i>et al.</i> , 2024a).

významnú súčasť signálneho mechanizmu, ktorú môžu EDC narušiť (Kopp *et al.*, 2017, Mimoto *et al.*, 2017). Riziko dlhodobých nepriaznivých zdravotných následkov sa zásadne zvyšuje v prípadoch, keď expozícia EDCs nastane v obdobiach formovania a diferenciacie orgánových systémov v raných štádiách vývinu (Braun, 2017, Toft, 2023, Celik a Yesildemir, 2025, Potiris *et al.*, 2025).

Vzhľadom na fakt, že ľudia sú exponovaní zmesiam rôznych EDCs z rôznych zdrojov (tzv. koktailový efekt), posudzovanie ich kumulatívneho rizika zostáva jednou z najväčších výziev súčasnej toxikológie a regulačnej vedy (Gore *et al.*, 2015). Klasifikácia EDCs podľa chemickej štruktúry, hlavných zdrojov expozície a zdravotných účinkov je zhrnutá v Tab. 1.

1.3 Bisfenol A (BPA)

BPA (2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propán, sumárny vzorec $C_{15}H_{16}O_2$, CAS 80-05-7) je biela kryštalická pevná látka vo forme prášku, ktorá sa využíva pri výrobe plastov, najmä epoxidových živíc a polykarbonátov, tvoriacich súčasť širokého spektra bežných spotrebných výrobkov. Pôvodne bola táto látka vyvinutá ako syntetický estrogén v rámci výskumu exogénnych syntetických estrogénov vhodných pre farmaceutický sektor. Hoci sa jeho estrogénna aktivita potvrdila, nebola taká silná ako u zlúčeniny dietylstilbestrol, čo viedlo k prehodnoteniu jeho farmaceutického využitia (Dodds a Lawson, 1936). Následne sa BPA začal uplatňovať v chemickom priemysle ako monomér pri výrobe rôznych polymérov, ako sú polykarbonátové plasty a epoxidové živice. Okrem toho sa používa aj ako antioxidant, inhibítor polymerizácie polyvinylchloridu a prekursor pri syntéze retardérov horenia (Geens *et al.*, 2011). Tieto materiály slúžia ako základ pre výrobu obrovského množstva spotrebných tovarov. Polykarbonáty sa napríklad využívajú na výrobu opakovane použiteľných plastových fliaš a nádob určených na skladovanie potravín. Epoxidové živice sa vo veľkej miere používajú ako ochranné nátery vnútri plechoviek na potraviny a nápoje, ako aj na vnútorných častiach vodovodných potrubí na rozvod pitnej vody. BPA je prítomný aj v širokom spektre iných produktov vrátane termálneho papiera, textílií, farieb, atramentov, lepidiel, automobilových náterov, stavebných materiálov (najmä podlahových krytín), hračiek, elektroniky, zdravotníckych pomôcok a zubných výplní (EEA, 2023).

Molekula BPA je známa ako endokrinný disruptor (látka narušajúca hormonálny systém) vďaka svojej schopnosti interagovať s viacerými jadrovými receptormi a tým meniť normálnu reguláciu génovej expresie.

Jadrové receptory sú intracelulárne proteíny, ktoré sa po naviazaní špecifického hormónu alebo inej lipofilnej molekuly (ligandu) presúvajú do jadra

bunky, kde fungujú ako transkripčné faktory (regulátory expresie génov). Za normálnych okolností sa po naviazaní endogénneho hormónu (napr. estradiolu na ER) receptor podrobí konformačnej zmene, dimerizuje a putuje do jadra. Komplex receptor-ligand (dimér) sa naviaže na špecifické sekvencie DNA nazývané elementy hormonálnej odpovede (HRE), ktoré sa nachádzajú v promótorových oblastiach cieľových génov. Naviazaný komplex potom spolu s koaktivátormi alebo korepresormi vedie k zmene chromatinovej štruktúry a následne k aktivácii (zvýšenej expresii) alebo inhibícii (zníženej expresii) cieľových génov (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

BPA má štrukturálnu podobnosť s niektorými endogénnymi hormónmi, čo mu umožňuje viazať sa na ich receptory. Tento xenoestrogén sa dokáže viazať na oba typy estrogénových receptorov (ER α a ER β), čím aktivuje estrogénovú signálnu dráhu (Gould *et al.*, 1998). V prípade väzby BPA na AR, ktorý normálne viaže samčie pohlavné hormóny (androgény), pôsobí BPA prevažne ako antagonista (Lee *et al.*, 2003). Významným cieľom BPA sú tiež receptory hormónov štítnej žľazy (TR), naviazaním na ne toto xenobiotikum potenciálne narúša metabolizmus a vývin regulovaný príslušnými hormónmi (Moriyama *et al.*, 2002). Môže sa tiež priamo viazať na glukokortikoidové receptory (GR α), čím napodobňuje účinky stresových hormónov (glukokortikoidov). Dlhodobé zvýšené hladiny glukokortikoidov potom vedú k potlačeniu imunitných funkcií a poškodeniu nervovej odolnosti (Liu *et al.*, 2019, Buoso *et al.*, 2021). BPA prejavuje vysokú afinitu aj k EER γ (receptor príbuzný estrogénu), ktorý je konštitutívne aktívny, ale BPA môže túto aktivitu ďalej modulovať (Okada *et al.*, 2008).

Keď sa na jadrový receptor naviaže BPA namiesto prirodzeného hormónu, môže pôsobiť dvojako: buď receptor aktivuje ako agonista (napr. po naviazaní na ER), pričom však často vykazuje inú potenciú ako prírodný ligand, čo vyústi do abnormálnej regulácie génov citlivých na estrogény; alebo receptor blokuje ako antagonista (napr. po naviazaní na AR), čím zabraňuje naviazaniu prirodzeného hormónu a aktivácii génov kontrolovaných androgénmi a narúša tak androgénnu signalizáciu. Okrem toho BPA narúša aj rekrutáciu (priťahnutie) koaktivátorov a korepresorov, čím zásadným spôsobom modifikuje transkripčnú odpoveď bunky.

Hlavnými cestami expozície, ktorými BPA vstupuje do ľudského tela, sú ingescia (požitie), inhalácia a dermálny kontakt (EFSA, 2015, Ramírez *et al.*, 2023). Vedecké poznatky konzistentne spájajú expozíciu BPA s etiológiou mnohých ľudských ochorení. Expozícia ľudí BPA môže viesť k narušeniu reprodukčného, neuroendokrinného a imunitného systému, ako aj k vzniku metabolických dysfunkcií u predtým zdravých jedincov (vom Saal *et al.*, 2009, Cimmino *et al.*, 2020, Tarafdar *et al.*, 2022).

V klinickej praxi bola detegovaná zvýšená sérová koncentrácia BPA u žien so syndrómom polycystických ovárií v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých žien (Vahedi *et al.*, 2016). Ďalej bola expozícia tomuto xenoestrogénu asociovaná so zvýšeným rizikom nevysvetliteľných rekurentných spontánnych potratov (Liang *et al.*, 2020), ako aj so spontánnym pôrodom a predčasným prasknutím plodových obalov (Behnia *et al.*, 2016). Prenatálna a skorá postnatálna expozícia môže byť spojená so závažnými vývinovými poruchami (Junge *et al.*, 2018, Jensen *et al.*, 2019). Vzhľadom na lipofilný charakter BPA je možná jeho bioakumulácia v materskom mlieku a následná absorpcia dojčatami (Çiftçi *et al.*, 2021). V kontexte mužskej reprodukcie štúdia Ji *et al.* (2018) ukázala, že BPA znižuje kvalitu spermií, oslabuje sexuálnu funkciu a znižuje fertilitu (Ji *et al.*, 2018). BPA sa taktiež dáva do súvislosti s patogenézou hypertenzie a kardiovaskulárnych ochorení (Han a Hong, 2016). Čo sa týka účinkov na metabolizmus, predpokladá sa, že môže prispievať k rozvoju obezity a diabetu 2. typu spojeného s inzulínovou rezistenciou (Wade, 2020). Okrem toho, ako uvádza prehľadová práca (Shafei *et al.*, 2018), vyššie koncentrácie tejto zlúčeniny predstavujú rizikový faktor pre vznik onkologických ochorení vrátane karcinómov ovárií, krčka maternice, prsníka, prostaty a pľúc.

Tieto zistenia o potenciálnych zdravotných rizikách viedli k potrebe regulačných zásahov na úrovni verejného zdravia. Regulácia BPA v Európskej únii prešla za posledné desaťročia dynamickým vývojom, ktorý odštartoval už v roku 2011 zákazom jeho používania v dojčenských fľašiach. Tento krok bol následne doplnený o ďalšie obmedzenia týkajúce sa nádob na potraviny pre dojčatá a malé deti (European Commission, 2011). Paralelne s celoeurópskymi pravidlami pristúpili niektoré členské štáty k ešte prísnejšej národnej regulácii. Príkladom je Francúzsko, ktoré zaviedlo úplný zákaz BPA vo všetkých obaloch prichádzajúcich do styku s potravinami (Legifrance - République Française, 2012), či Švédsko, ktoré obmedzilo jeho využitie v epoxidových materiáloch pri renovácii vodovodných potrubí v domácnostiach (Food Packaging Forum, 2016, Swedish Chemicals Agency, b.d.).

Zlomový moment nastal v roku 2017, keď Európska chemická agentúra (ECHA) zaradila BPA medzi látky vzbudzujúce veľmi veľké obavy (*Substances of Very High Concern* - SVHC) kvôli jej preukázaným endokrinným disruptčným účinkom (ECHA, 2017a). Vedecké poznatky o rizikách látky sa ďalej prehlbovali, čo v roku 2023 viedlo Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA) k dramatickému prehodnoteniu bezpečnosti. Tolerovateľný denný príjem (TDI) bol znížený zo 4 mg/kg na 0,2 ng/kg telesnej hmotnosti, a to najmä v reakcii na zistenia o vplyve BPA na nárast Th17 buniek u hlodavcov (EFSA, 2023). Celý proces vyvrcholil v decembri 2024, kedy Európska komisia prostredníctvom nariadenia 2024/3190 definitívne schválila zákaz BPA v materiá-

loch prichádzajúcich do styku s potravinami (Official Journal of the European Union, 2024).

Všetky tieto regulačné obmedzenia viedli postupne k rozsiahlemu vývoju a používaniu mnohých štrukturálne podobných substitútov BPA, pričom ako suroviny na výrobu epoxidových a polykarbonátových živíc, termopapierov a spevnených plastov sa najčastejšie používa bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF) a bisfenol AF (BPAF) (Chen, 2016a).

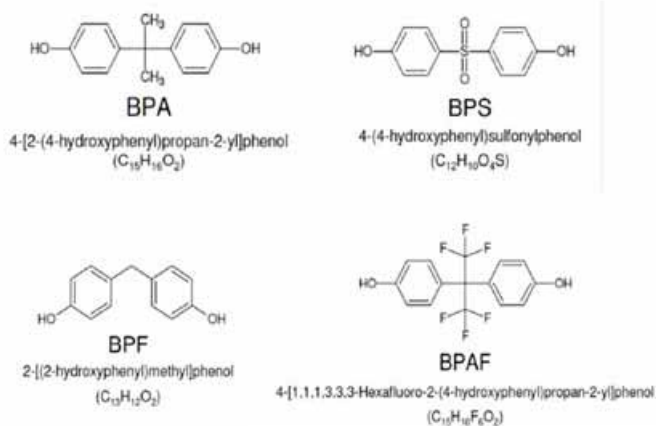
1.4 Substitúty BPA

S rastúcim povedomím o zdravotných rizikách spojených s BPA a v dôsledku prijímania regulačných opatrení je tento materiál postupne nahrádzaný inými štrukturálne príbuznými bisfenolmi. Tieto látky vykazujú porovnateľnú funkčnosť a umožňujú ich implementáciu bez potreby zásadného prepracovania existujúcich výrobných procesov. Keďže však biologické a toxikologické účinky chemických látok úzko súvisia s ich molekulovou štruktúrou, alternatívy BPA, ktoré si zachovávajú vysokú mieru štrukturálnej podobnosti (Obr. 1) nemožno považovať za menej znepokojujúce. Napriek tomu sa im v porovnaní s BPA venuje podstatne menšia regulačná pozornosť, čo predstavuje potenciálnu medzeru v hodnotení ich rizík pre ľudské zdravie a životné prostredie.

Analógy BPA sa v súčasnosti široko využívajú v rozličných spotrebiteľských výrobkoch, ktoré sú uvádzané na trh s označením „BPA-free“, čím sa u spotrebiteľov vytvára dojem vyššej zdravotnej a environmentálnej bezpečnosti. Napriek obmedzeniam a zákazom BPA v určitých aplikáciách zostáva väčšina jeho štrukturálne príbuzných analógov regulovaná menej prísne alebo len čiastočne. V regulačnom rámci Európskej únie, najmä v kontexte Nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* – REACH), sa hodnotenie týchto analógov BPA často opiera o predpoklad funkčnej ekvivalencie bez dostatočného zohľadnenia ich potenciálnych dlhodobých účinkov, čo môže viesť k tzv. nežiaducim substitúciám („*regrettable substitution*“) (ECHA, 2017b). Dostupné štúdie pritom ukazujú, že substitúty BPA sa v dôsledku ich kontinuálneho uvoľňovania z výrobkov opakovane detegujú v zložkách životného prostredia vrátane povrchových a podzemných vôd, pôdy a bioty (Banaderakhshan *et al.*, 2022, Jin a Zhu, 2016). Štúdia Srebny *et al.* (2025), využívajúca široké spektrum *in vitro* testov a kumulatívny skórovací systém na porovnanie toxikologických profilov BPA a jeho alternatív, ukázala, že štrukturálne podobné alternatívy vykazovali porovnateľnú schopnosť aktivovať ERα ako samotné BPA. Tento

výsledok naznačuje, že niektoré zlúčeniny, označované ako „BPA-free“, môžu mať rovnaký endokrinný účinok ako BPA. Naopak, objemnejšie substitúcie v para- a orto-polohe fenolových kruhov viedli k eliminácii estrogénnej aktivity, pravdepodobne v dôsledku sterických prekážok znemožňujúcich väzbu molekúl na ER α . Niektoré z takto modifikovaných zlúčenín však aktivovali (PPAR γ), ktorý BPA sám o sebe neaktivuje, čo poukazuje na posun v mechanizme biologického účinku. Takáto zmena signálnej dráhy môže viesť k odlišným toxikologickým prejavom, ktoré nemusia byť zachytené pri štandardnom hodnotení estrogénnej aktivity. Okrem toho autori pri niektorých alternatívach BPA v *in vitro* testoch zaznamenali mitochondriálnu dysfunkciu a neurotoxicitu, čo naznačuje, že tieto látky môžu vykazovať širšie spektrum toxických účinkov, presahujúce rámec endokrinného narušenia (Srebny *et al.*, 2025).

Tieto skutočnosti poukazujú na potenciálnu medzeru v súčasnom regulačnom prístupe, keďže nedostatočne preskúmané analógy BPA môžu predstavovať porovnateľné riziko pre ľudské zdravie aj životné prostredie, čím sa spochybňuje opodstatnenosť ich označovania za bezpečnejšie alternatívy.



Obr. 1: Porovnanie chemickej štruktúry BPA, BPS, BPF a BPAF.

Obr. 1 ilustruje rozdiely v mostíku, ktorý spája dva fenolové kruhy: BPF má v strede najjednoduchší metylénový mostík (-CH₂-), BPA izopropylidénovú skupinu (uhlík s dvoma metylmi -CH₃-), BPS sulfonylovú skupinu (-SO₂-), BPAF hexafluorizopropylidénovú skupinu (uhlík s dvoma -CF₃- skupinami) (upravené podľa: Santoro *et. al.*, 2019)

1.4.1 Bisfenol S (BPS)

BPS (4,4'-sulfonyldifenol) evidovaný pod registračným číslom CAS 80-09-1, je synteticky pripravená organická chemická zlúčenina, definovaná su-

márnym vzorcom $C_{12}H_{10}O_4S$. Z chemického hľadiska je BPS charakterizovaný prítomnosťou dvoch fenolových funkčných skupín, ktoré sú navzájom spojené centrálnou sulfonylovou skupinou. Vzájomné odlišenie BPA a BPS spočíva v charaktere spojovacieho segmentu: kým BPS obsahuje vo svojej molekule sulfonylovú skupinu – čo je aj dôvodom pre písmeno „S“ v názve – BPA využíva na spojenie dimetylmetylénovú skupinu (Obr. 1).

Pretože BPS sa stal jednou z najviac využívaných náhrad BPA, je súčasťou mnohých spotrebiteľských výrobkov, s ktorými prichádzajú ľudia do kontaktu na dennej báze. Predpokladalo sa, že BPS nahradí BPA vo všetkých smeroch, ale nebude vykazovať nepriaznivé účinky na zdravie. Tieto úvahy boli v značnej miere spojené s nedostatkom relevantných informácií o pôsobení tejto zlúčeniny na živé organizmy. Obrovskou chybou bolo, že jeho použitie bolo schválené bez toho, aby bolo vykonané hodnotenie jeho potenciálnych zdravotných rizík najmä pri expozícii nízkym dávkam. Rast používania BPS zvyšuje jeho uvoľňovanie do životného prostredia, čo vedie k nárastu jeho koncentrácií vo vode, pôde, sedimentoch, prachu a vzduchu, a tým zvyšuje potenciálne environmentálne a zdravotné riziká pre ľudí a ekosystémy. Okrem toho bol v roku 2012 prvýkrát detegovaný aj v ľudskom moči (Wu *et al.*, 2018).

Rozsiahla vedecká dokumentácia naznačuje, že BPS (podobne ako mnohé iné náhrady BPA) nepredstavuje bezpečné riešenie. Nakoľko táto náhrada BPA vykazuje negatívne účinky na endokrinný a reprodukčný systém a indukuje vývinovú toxicitu, má podobné riziká ako BPA (Wiklund a Beronius, 2022, Zhang *et al.*, 2025, Xu *et al.*, 2024). Štúdie hodnotiace vplyv expozície BPS na organizmy vyvolali vážne obavy z jeho endokrinne disruptívneho účinku. BPS sa spája s vyšším rizikom kardiovaskulárnych ochorení a je známe, že môže poškodzovať reprodukčný systém prostredníctvom oxidačného stresu a hormonálnych zmien (Nourian *et al.*, 2020). Konkrétne, pôsobí ako agonista estrogénového receptora α (ER α), čím podporuje rast nádorových buniek a zvyšuje riziko rakoviny prsníka (Thoene *et al.*, 2020). Negatívny vplyv BPS na reprodukčnú sústavu je potvrdený aj na bunkovej úrovni naprieč rôznymi druhmi. Napr. experimenty *in vitro* s hovädzimi oocytmi preukázali, že BPS zvyšuje embryonálnu aretáciu a apoptózu (Saleh *et al.*, 2021). Chronická expozícia u mužov môže navyše viesť k neplodnosti narušením sekrécie gonadotropínov, štrukturálnym zmenám semenníkov a poruchám spermatogenézy (Ullah H *et al.*, 2021). Potenciálny negatívny dopad na fertilitu je badateľný aj pri nízkych koncentráciách. *In vitro* štúdie ukázali negatívny vplyv BPS na maturáciu prasačích oocytov: po 24 – 48 hodinách kultivácie komplexov kumulus-oocytov s BPS (3, 30, 300 nM) bol zaznamenaný dávkovo závislý pokles metafázy I a II (Žalmanová *et al.*, 2017). Podobne aj u embrií *C. elegans* vystavených nízkym dávkam BPS sa zistilo, že dospelé jedince znášali menej

vajíčok, čo poukazuje na možný negatívny dopad na fertilitu naprieč druhmi (Mersha *et al.*, 2015). Výskum publikovaný v r. 2024 potvrdzuje, že BPS spôsobuje nadmernú syntézu estrogénu priamou väzbou a aktiváciou receptora folikulostimulačného hormónu a jeho následnej signálnej dráhy cAMP/PKA (Zhang *et al.*, 2024).

Vzhľadom na rastúce dôkazy o nepriaznivých účinkoch BPS zaradila ECHA tento substitút BPA v r. 2023 do svojho kandidátskeho zoznamu látok vzbudzujúcich veľmi veľké obavy (ECHA, 2023). Toto zaradenie podčiarkuje potrebu pokračujúceho monitorovania a hodnotenia rizík spojených s používaním BPS predovšetkým v aplikáciách prichádzajúcich do styku s potravinami.

1.4.2 Bisfenol F (BPF)

BPF, 4,4'-dihydroxydifenylnmetán, (CAS 620-92-8, sumárny vzorec $C_{13}H_{12}O_2$) je štrukturálny analóg BPA (Obr. 1), ktorý sa používa ako jeho náhrada najmä pri výrobe epoxidových živíc a polykarbonátov. Písmeno „F“ v jeho názve pochádza z formaldehydu, ktorý tvorí metylénový mostík ($-CH_2-$) medzi dvoma fenolovými kruhmi. V porovnaní s BPA má BPF kratší spojovací segment (mostík), čo ovplyvňuje jeho fyzikálno-chemické vlastnosti, nižšiu molekulovú hmotnosť, mierne nižšiu lipofilitu a vyššiu rozpustnosť vo vode, pričom teplota topenia oboch látok je porovnateľná. Pre svoju tepelnú a mechanickú odolnosť sa nachádza v náteroch, lepidlách, obaloch potravín, kozmetike a papierových výrobkoch (Rochester a Bolden, 2015).

Vzhľadom na výraznú podobnosť s BPA sa predpokladá, že by mohol vykazovať porovnateľné biologické účinky, hoci zatiaľ nepodlieha regulácii podľa REACH (Wiklund a Beronius, 2022). So zvyšujúcou sa výrobou bol BPF identifikovaný ako environmentálny kontaminant prítomný vo vode, pôde, sedimentoch aj v telách živých organizmov vrátane človeka. Je schopný perzistovať a vstupovať do potravinového reťazca, pričom jeho prítomnosť v odpadových vodách poukazuje na nedostatočnú účinnosť čistiarní odpadových vôd (Du *et al.*, 2024).

BPF bol detegovaný aj v biologických vzorkách ľudí, ako je moč či materské mlieko. Hlavnými cestami expozície sú potraviny a dermálna absorpcia, pričom osobitné obavy vyvoláva jeho prítomnosť v dámskych hygienických pomôckach, ktoré môžu predstavovať zdroj dlhodobej expozície žien (Wiklund a Beronius, 2022, Gao a Kannan, 2020).

Hoci je BPF považovaný za bezpečnejšiu alternatívu BPA, viaceré štúdie poukazujú na jeho endokrinné disruptívne účinky vrátane estrogénnej a antiandrogénnej aktivity (Rochester a Bolden, 2015). Experimentálne práce

preukázali genotoxické, karcinogénne a reprodukčné účinky BPF, poškodenie DNA a narušenie metabolizmu lipidov (Eladak *et al.*, 2015, Lehmler *et al.*, 2018). Významné je, že metabolity BPF môžu vykazovať vyššiu estrogénnu aktivitu než metabolity BPA (Shao *et al.*, 2021).

Štúdie na zvieratách potvrdili negatívny vplyv BPF na hormonálnu rovnováhu, erektilnú funkciu a kvalitu spermií (Odetayo a Olayaki, 2022). Okrem toho sa ukazuje aj jeho potenciálne škodlivé pôsobenie na kostné tkanivo prostredníctvom inhibície funkcie osteoblastov, pričom jeho účinky sú porovnateľné s inými bisfenolmi (García-Recio *et al.*, 2023).

Na základe dostupných experimentálnych dôkazov ECHA pripravuje jeho zaradenie medzi látky toxické pre reprodukciu (Repr. 1B) a environmentálne nebezpečné látky, čo by viedlo k výraznému sprísneniu regulačného režimu (SGS Société Générale de Surveillance SA, 2026).

1.4.3 Bisfenol AF (BPAF)

BPAF – 4,4'-(hexafluóroizopropylidén) difenol (CAS 1478-61-1) je fluórovaná organická zlúčenina s molekulárnym vzorcom $C_{15}H_{10}F_6O_2$. Chemicky ide o štrukturálny analóg BPA, kde sú dve metylové skupiny nahradené trifluórmetylovými skupinami (Obr. 1).

Slúži ako sieťovacie a vytvrdzovacie činidlo pri spracovaní fluoropolymérov, fluóroelastomérov a kaučuku. Pridaním BPAF sa menia vlastnosti polyméru, pričom fluóroelastoméry vytvrdené BPAF vykazujú vynikajúcu tepelnú stabilitu, chemickú odolnosť a odolnosť proti stlačeniu. Vďaka týmto vlastnostiam sa ponúka ich široké využitie v procese výroby iných druhov plastových materiálov. (National Toxicology Program, 2022).

BPAF je v prílohe III nariadenia REACH uvedený ako látka podozrivá z nebezpečnosti pre vodné prostredie a ako perzistujúca látka. Má veľmi nízku schopnosť biodegradácie, čo vedie k perzistencii vo vode, pôde a sedimente (National Toxicology Program, 2022).

Tento typ bisfenolu vykazuje výrazne vyššiu afinitu k estrogénovým receptorom než bežný bisfenol A, pričom pôsobí ako duálny modulátor s odlišným účinkom na ich podtypy. Kým na receptore ER α funguje ako plný agonista stimulujúci estrogénovú aktivitu, na receptore ER β pôsobí ako špecifický antagonist, ktorý aktívne blokuje účinky prirodzeného estradiolu. Táto kombinácia narúša hormonálnu rovnováhu tým, že súčasne aktivuje rastové signály a potláča prirodzené regulačné mechanizmy bunky (Matsushima *et al.*, 2010).

Nepriamo, avšak významným ukazovateľom rozsahu spotreby BPAF je jeho detekcia v životnom prostredí a v živých organizmoch vrátane ľudskej po-

Tab. 2: Chemické vzorce a štruktúry, biologické a zdravotné účinky a regulačný status vybraných bisfenolov (BPA, BPS, BPF, BPAF)

	Chemický vzorec a štruktúra	Biologické a zdravotné účinky	Regulácia a zistenia
BPA	$C_{15}H_{16}O_2$, 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan. Obsahuje izopropylidénový mostík (uhlík s dvoma metylmi $-CH_3$), spájajúci dva fenolové kruhy.	Endokrinný disruptor (agonista ER; antagonist AR, ovplyvňuje TR, GR a ERR). Spôsobuje reprodukčné poruchy (Ji <i>et al.</i> , 2018, Vahedi <i>et al.</i> , 2016), metabolické dysfunkcie (Wade, 2020), hypertenziu a kardiovaskulárne poruchy (Han a Hong, 2016). Riziko vzniku onkologických ochorení (Shafiei <i>et al.</i> , 2018).	V r. 2011 obmedzenia, týkajúce sa nádob na potraviny pre dočatá a malé deti (European Commission, 2011). V r. 2017 zaradený medzi látky vzbudzujúce veľmi veľké obavy (ECHA, 2017a). V r. 2024 schválený definitívny zákaz v materiáloch prichádzajúcich do styku s potravinami (Official Journal of the European Union, 2024).
BPS	$C_{15}H_{10}O_4S$, 4,4'-sulfonyldifenol. Obsahuje centrálnu sulfonylovú skupinu ($-SO_2-$).	Agonista ER. Spôsobuje nadmernú syntézu estrogénu spojenú s rizikom vzniku nádorov prsníka (Thoenes <i>et al.</i> , 2020). Zvyšuje embryonálnu arétiáciu a apoptózu oocytov (Saleh <i>et al.</i> , 2021), spôsobuje poruchy spermatogenézy a riziko neplodnosti mužov (Ullah H <i>et al.</i> , 2021). Spojený s rizikom kardiovaskulárnych ochorení (Nourian <i>et al.</i> , 2020).	V r. 2023 zaradený na kandidátsky zoznam látok vzbudzujúcich veľmi veľké obavy (SVHC) podľa nariadenia REACH (ECHA, 2023).
BPF	$C_{13}H_{12}O_2$, 4,4'-dihydroxydifenylmetán. Obsahuje metylénový mostík ($-CH_2-$), spájajúci dva fenolové kruhy.	Vykazuje estrogénnu a antiandrogénnu aktivitu (Rochester a Bolden, 2015). Negatívne vplyva na hormonálnu rovnováhu, erektilnú funkciu a kvalitu spermií (Odetoayo a Olayaki, 2022). Vykazuje genotoxické účinky (Eladak <i>et al.</i> , 2015).	Zatiaľ nepodlieha regulácii podľa nariadenia REACH. ECHA pripravuje jeho zaradenie medzi látky toxické pre reprodukciu (Repr. 1B) a ekologicky problematické látky (SGS Société Générale de Surveillance SA, 2026).
BPAF	$C_{15}H_{10}F_6O_2$, 4,4'-hexafluóro-izopropylidén)difenol. Obsahuje hexafluóro-izopropylidénový mostík (uhlík s dvoma $-CF_3$ skupinami).	Významný transplacentárny prenos na plod (Pan <i>et al.</i> , 2020). Narušenie schopnosti množenia, dozrievania a migrácie ľudských neurálnych progenitrových buniek <i>in vitro</i> štúdií kvôli vyvolaniu silného oxidačného stresu (Luo <i>et al.</i> , 2025).	Podzrivý z nebezpečnosti pre vodné prostredie (National Toxicology Program, 2022). Zatiaľ nepodlieha obmedzeniam podľa nariadenia REACH. ECHA pripravuje jeho zaradenie medzi látky toxické pre reprodukciu (Repr. 1B) a environmentálne problematické látky (SGS Société Générale de Surveillance SA, 2026).

pulácie. V kontexte týchto zistení, a s cieľom komplexne vyhodnotiť prípadné negatívne dôsledky expozície, v súčasnosti intenzívne prebiehajú *in vivo* štúdie (PubChem, 2025). Rozsiahla expozícia je potvrdená špecifickými biomonitringovými dátami. Koncentrácie BPAF boli napr. zistené vo vzorkách moču študentov na juhu Číny, kde sa látka detegovala až v 85 % vzoriek (s mediánom 0,03 ng/ml moču) (Zhang *et al.*, 2020). Podobne znepokojujúce výsledky priniesla ďalšia čínska štúdia, ktorá zistila prítomnosť BPAF v 33 % vzoriek séra tehotných žien (s koncentráciami dosahujúcimi až 0,4 ng/ml). Prenos na vyvíjajúci sa plod a súvisiace riziko akumulácie boli zdokumentované detekciou BPAF v materskej plazme (priem. 13,1 pg/g), placente (priem. 28,4 pg/g) a v pupočníkovej plazme (priem. 80,4 pg/g). Vyššie koncentrácie namerané práve v pupočníkovej plazme potvrdzujú významný transplacentárny prenos na plod. Okrem toho bol BPAF zaznamenaný aj v 21 % vzoriek materského mlieka (priem. 0,092 ng/ml) (Pan *et al.*, 2020). Obzvlášť znepokojujivé sú výsledky biomonitoringu v Európskej únii, kde boli u detí pozorované podstatne vyššie koncentrácie BPAF (až 88,3 ng/l moču) v ostrom kontraste s dospelými, u ktorých koncentrácia často klesala pod detekčný limit (Husøy *et al.*, 2019). *In vitro* experimenty na imortalizovaných ľudských neurálnych progenitorových bunkách potvrdili neurovývinovú toxicitu BPAF, ktorá sa prejavuje inhibíciou proliferácie a migrácie buniek v dôsledku indukcie oxidačného stresu (Luo *et al.*, 2025). Z dôvodu pretrvávajúceho nedostatku adekvátnych informácií o škodlivých účinkoch BPAF sa momentálne pokračuje v sérii *in vivo* štúdií, ktoré sú zamerané na preskúmanie a kvantifikáciu možných negatívnych dôsledkov expozície.

Komplexný prehľad chemických vzorcov, biologických a zdravotných dopadov, ako aj platných regulačných rámcov pre vybrané bisfenoly (BPA, BPS, BPF a BPAF) je systematicky spracovaný v Tab. 2.

1.4.4 Ďalšie alternatívy BPA

ECHA v roku 2021 v rámci hodnotenia regulačných potrieb (*Assessment of Regulatory Needs*) systematicky preskúmala dostupné údaje o alternatívach BPA a rozdelila ich do štyroch kategórií: (i) zlúčeniny, pri ktorých je potrebné uplatniť regulačné obmedzenia; (ii) zlúčeniny, pre ktoré sa v súčasnosti generujú doplňujúce údaje; (iii) zlúčeniny, ktoré si podľa dostupných poznatkov nevyžadujú riadenie rizík na úrovni EÚ; a (iv) zlúčeniny, ktorých nebezpečnosť nie je možné jednoznačne posúdiť z dôvodu výrazného nedostatku toxikologických a expozičných údajov (ECHA, 2021).

Do poslednej skupiny patria viaceré menej preskúmané bisfenoly, ako na-

príklad bisfenol Z (BPZ), bisfenol C2 (BPC2), bisfenol S 4-benzyléter (BPS-MPE), bisfenol-TMC (BP-TMC), bisfenol FL (BPFL), bisfenol AP (BPAP), bisfenol S 4-alyléter (BPS-MAE), bisfenol P (BPP), bisfenol E (BPE), bisfenol G (BPG), bisfenol PH (BPPH) a bisfenol BP (BPBP). Pre tieto látky sú dostupné len obmedzené údaje o ich fyzikálno-chemických vlastnostiach, environmentálnom správaní, metabolizme a biologických účinkoch, pričom komplexné toxikologické profily vo väčšine prípadov chýbajú (ECHA, 2021).

Pri látkach BPE a BPFL už výskum na zvieratách preukázal poškodenie pečene, plodnosti a hormonálnej rovnováhy. Pri ďalších náhradách (BPG, BPP, BPPH a BPZ) síce ešte nemáme dostatok priamych dôkazov z laboratórií, no počítačové simulácie varujú pred ich vysokou nebezpečnosťou (Franko *et al.*, 2024).

Aktuálne dáta odкрývajú významné medzery v regulácii a zdôrazňujú potrebu preventívneho hodnotenia bezpečnosti bisfenolov ešte pred ich masovým uvedením na trh.

2. MODELOVÝ ORGANIZMUS *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Potreba minimalizovať etické a logistické obmedzenia spojené s výskumom na stavovcoch viedla k intenzívnemu hľadaniu relevantných modelových alternatív. Nematóda *C. elegans* predstavuje pre tento účel mimoriadne vhodný model, ponúkajúci významné ekonomické, etické a praktické benefity.

C. elegans je mikroskopický hlístovec dosahujúci dĺžku približne 1 mm, ktorý sa v prirodzenom prostredí živí baktériami a hubami prítomnými v pôde, ako aj na rozkladajúcom sa organickom materiáli, napríklad ovocí. *C. elegans* sa ako modelový organizmus v oblasti biológie a genetiky začal etablovať v druhej polovici 20. storočia vďaka priekopníckej práci Sydneyho Brennera, ktorý v roku 1974 publikoval prvé významné genetické výsledky, ktoré demonštrovali potenciál tohto malého hlístovca pre molekulárnu a vývinovú biológiu (Brenner, 1974). Brennerove iniciatívy pokračovali aj v práci ďalších výskumníkov: John Sulston mapoval celú bunkovú líniu *C. elegans* pri jeho vývine od vajíčka po dospelého jedinca (Sulston a Horvitz, 1977) a H. Robert Horvitz charakterizoval kľúčové gény zodpovedné za naprogramovanú bunkovú smrť (apoptózu), čím vytvorili základ pre pochopenie regulačných mechanizmov organizmu a prepojili ich s homologickými génmi v iných eukaryotoch (Ellis a Horvitz, 1986). Spoločné úspechy týchto troch vedcov – Brennera, Sulstona a Horvitz – boli ocenené Nobelovou cenou za fyziológiu alebo medicínu v roku 2002 za objavy týkajúce sa genetickej regulácie vývinu orgánov a programovanej bunkovej smrti, pri ktorých sa používal model *C. elegans* (Marx, 2002).

Odvtedy sa využitie tohto malého hlístovca výrazne rozšírilo a *C. elegans* sa stal kľúčovým modelom pre štúdium molekulárnych a bunkových mechanizmov, vývinovej biológie, neurovedy, ako aj mechanizmov regulácie génovej expresie, medzi ktoré patrí aj RNA interferencia. Vďaka svojej jednoduchosti, krátkemu životnému cyklu a genetickej manipulovateľnosti poskytuje *C. elegans* unikátnu platformu na detailné skúmanie procesov sprostredkovaných malými RNA molekulami, ako sú krátke interferujúce RNA (siRNA) a mikroRNA (miRNA), ktoré umožňujú selektívne a precízne utlmenie génovej expresie.

2.1 Biologické vlastnosti a životný cyklus

C. elegans, ako reprezentant kmeňa *Nematoda* sa vyznačuje nesegmentovanou, obojstranne symetrickou a valcovitou telesnou stavbou, s progresívnym zúžením v apikálnej a bazálnej časti. Táto telesná organizácia je charakterizovaná usporiadaním do dvoch sústredných trubíc, vonkajšej a vnútornej, ktoré sú navzájom oddelené pseudocoelomickým priestorom. Vonkajšia trubica, predstavujúca telesnú stenu, zahŕňa vrstvy nevyhnutné pre integritu a interakciu s externým prostredím. Jej súčasťou je kolagénová kutikula, ktorá tvorí ochranný exoskelet, pod ktorou sa nachádza hypodermis, svalová sústava (muskulatura), periférne zložky nervovej sústavy a exkrecný systém. Vnútoraná trubica inkorporuje vitálne orgánové sústavy, konkrétne tráviacu sústavu (črevo) a u dospelých jedincov reprodukčné orgány (gonády). Všetky vnútorné a vonkajšie telesné kompartmenty sú pod stálym hydrostatickým tlakom, ktorý je kritický pre udržanie turgoru a telesného tvaru. Tento tlak je precízne modulovaný prostredníctvom osmoregulačného mechanizmu (Altun a Hall, 2009).

Dospelý organizmus *C. elegans* sa vyznačuje transparentnou telesnou schránkou, ktorá dosahuje štandardnú dĺžku približne 1 mm a maximálnu hrúbku rádo 80 μm . Dôležitým poznatkom v biológii tohto druhu je jeho stály a presne určený počet somatických buniek. Telo dospelého jedinca je zložené z presne 959 somatických buniek. Konečný počet somatických buniek je u dospelých hermafroditov konštantný a je výsledkom presne definovanej sekvencie bunkových delení, ktorá je striktne reprodukovaná v každom oplodnenom vajíčku. Z tohto dôvodu je *C. elegans* považovaný za modelový organizmus s determináčnym vývinom, kde je osud (diferenciácia) každej bunky fixne určený už v momente jej vzniku (Sulston *et al.*, 1987).

Významnou výhodou *C. elegans* je jeho schopnosť rýchlej a početnej reprodukcie. U *C. elegans* sa vyskytujú dve pohlavia – samec (0,1 %) a hermafrodit (99,9 %). Hermafroditné jedince sú schopné samooplodnenia a môžu produkovať stovky potomkov. Táto schopnosť s predstavuje významnú výhodu pri využívaní *C. elegans* ako modelového organizmu, a to nielen z dôvodu rýchlej a početnej reprodukcie, ale aj preto, že niektoré mutantné kmene *C. elegans* môžu mať zníženú pohyblivosť a napriek tomu sú schopné reprodukcie bez potreby vyhľadania partnera.

Vývinový cyklus *C. elegans* je podobný iným nepatogénnym hlístovcom, pozostáva z embryonálneho štádia, štyroch larválnych štádií (L1, L2, L3 a L4) a dospelého imága. Trvanie cyklu závisí od teploty postredia, pri teplote 20 °C trvá vývin od embrya po dospelé gravidné hermafroditné jedince približne do 72 hodín. Tranzícia medzi jednotlivými larválnymi štádiami zahŕňa zvliekanie

starého obalu a krátku fázu nečinnosti – letargus, počas ktorej dochádza k syntéze novej kutikuly (Altun a Hall, 2009).

Vývin prebieha po jednej z dvoch trajektórií, ktoré sú dané podmienkami prostredia. Pri optimálnych podmienkach (dostatok potravy a vhodná teplota) larvy plynule prechádzajú štádiami L1 až L4 a dosahujú dospelosť za 2 – 4 dni (kanonický, normálny cyklus). Ak nastane environmentálny stres (napr. nedostatok potravy, vysoká hustota populácie), larvy L1 vstúpia do alternatívneho L2 štádia, ktoré vedie k formovaniu tzv. dauer larvy (alternatívne L3 štádium). Dauer larva predstavuje dormantnú formu s modifikovanou kutikulou, ktorá prekrýva aj ústny otvor, čím zastavuje príjem potravy a vývin. Dauer larvy sú vysoko rezistentné a môžu prežiť mesiace; po zlepšení podmienok pokračujú vo vývine ako štádium L4 (Frézal a Félix, 2015, Golden a Riddle, 1984).

Hermafroditné jedince vstupujú do fázy samooplodňovania (autofekundácie) približne 12 hodín po dokončení zvliekania v L4 štádiu, čím iniciujú reprodukčnú periódu. V prípade, že dôjde k aloploidnému páreniu so samcom, je hermafrodit schopný generovať dodatočné potomstvo vďaka prísunu exogénnych spermií. Po vyčerpaní reprodukčného potenciálu a ukončení kladenia vajíčok prežívajú dospelé nematódy v postreprodukčnej fáze ešte približne dva až tri týždne, kým nevyhnutne nastane senescencia (starnutie) a následná smrť (Corsi *et al.*, 2015).

Stály a presne definovaný počet somatických buniek (eutélia) je dosiahnutý vďaka rigidnému programu bunkového vývinu, kde je presný počet buniek generovaný v dvoch hlavných fázach. Počas embryonálnej fázy dochádza k prvotnej proliferácii, ktorá vedie k vyliahnutiu larvy L1 pozostávajúcej z približne 550 buniek. Tieto bunky predstavujú základnú anatomickú konfiguráciu, avšak nemajú plne diferencované dospelé štruktúry. Presný počet 959 somatických buniek u dospelého hermafrodita je generovaný sériou presne naprogramovaných postembryonálnych bunkových delení (mitóz). Počas vývinu od zygoty prebehne celkovo 1 090 mitóz (delení), ktoré vyprodukujú 1 090 buniek, z ktorých 959 prežije a tvorí dospelý somatický organizmus a 131 buniek podstúpi apoptózu (Sulston *et al.*, 1983).

2.2 Využitie *C. elegans* pri štúdiu vplyvu xenobiotík na endokrinný systém

V kontexte skúmania environmentálnej toxikológie sa *C. elegans* javí ako perspektívny model pre štúdium EDCs. Táto heterogénna skupina chemických látok zahŕňa napríklad BPA a jeho alternatívne analógy, ktoré sú široko využívané pri syntéze epoxidových živíc a polykarbonátových plastov – kľúčových

komponentov mnohých spotrebných produktov. Tieto exogénne látky majú kapacitu narušiť fyziologickú hormonálnu rovnováhu a integritu endokrinného systému, čo potenciálne negatívne ovplyvňuje zdravie a reprodukčnú kondíciu živočíchov vrátane človeka (Brehm a Flaws, 2019, Chen *et al.*, 2024).

U *C. elegans* reguluje endokrinný systém kľúčové fyziologické procesy, ako sú zvliekanie, postembryonálny vývin, energetický metabolizmus, reprodukcia a regulácia správania (vrátane príjmu potravy, defekácie a párenia) (Antebi, 2006). Preto je tento organizmus cenným modelom na dešifrovanie genetických a biochemických dráh endokrinného signalizovania, ktoré sú často homologické s dráhami relevantnými pre ľudskú biológiu a medicínu. Rozsiahle genetické analýzy *C. elegans* identifikovali gény, ktoré sú priamo zapojené do inzulínovej signalizačnej dráhy alebo sú ňou nepriamo regulované (Wescott *et al.*, 2016).

Kultivácia *C. elegans* na agarových platniach je navyše technicky nenáročná a ekonomicky efektívna aj v štandardnom laboratórnom prostredí. Komplexná anatómia a vývinová trajektória tohto hlístovca boli už detailne popísané. Je dôležité, že dospelý jedinec disponuje základnými orgánovými sústavami – vrátane tráviacej, vylučovacej, svalovej a nervovej sústavy – ktoré sú typické aj pre fylogeneticky vyššie organizmy. Táto konštelácia špecifických atribútov robí z *C. elegans* mimoriadne relevantný modelový systém pre výskum v oblasti biomedicíny a stanovenia vplyvu látok v životnom prostredí (Hilliard *et al.*, 2002).

V rámci laboratórnych protokolov dominuje využívanie štandardného (referenčného) kmeňa *C. elegans* N2 (Bristol) („wild type“), ktorý sa nasadzuje na misky s médiom pre rast nematód (NGM - *Nemathode Growth Medium*) spolu s baktériou *Escherichia coli* OP50. Tento uracil-auxotrofný kmeň baktérií slúži nematódam ako potrava, pričom jeho regulovaný rast na substráte je dôležitý pre nerušenú vizuálnu kontrolu a monitoring hlístovcov (Indong *et al.*, 2024). Vďaka vysokej kompatibilite s modernými metodikami a možnosti uchovávanía veľkého počtu jedincov na mikrotitračných platniach umožňuje tento model simultánne testovanie širokého spektra látok a ich koncentrácií, čím efektívne napĺňa požiadavky na vysokovýkonný skrining, napríklad v prípade bisfenolov (Hunt, 2017). Okrem nízkych nákladov a krátkeho životného cyklu umocňuje význam hlístovca *C. elegans* aj jeho unikátna genetická charakteristika, keďže sa v roku 1998 stal prvým mnohobunkovým organizmom s kompletne sekvenovaným genómom (The *C. elegans* sequencing consortium, 1998). Tento mílnik otvoril cestu k precíznym molekulárnym manipuláciám a vývinu transgénnych reportérových línií, ktoré slúžia na *in vivo* monitorovanie oxidačného stresu, genotoxicity či zmien v génovej expresii. Relevantnosť pre humánnu medicínu je podčiarknutá faktom, že približne 42 % ľudských

génov má v genóme tejto hlístice svoj ortológ, čo cez genetické skríniny dovoľuje identifikovať proteíny a dráhy kľúčové pre ľudské ochorenia (Baumeister a Ge, 2002). Experimentálne protokoly pri testovaní chemikálií zvyčajne zahŕňajú inkubáciu v médiu s toxickou látkou a následné sledovanie markerov, akými sú letalita, rast, motilita či reprodukčné schopnosti (Williams *et al.*, 2017), pričom vysoká citlivosť nematód na environmentálnu záťaž z nich robí ideálny systém aj na štúdium vplyvu nanočastíc a rôznych extraktov (Melnikov *et al.*, 2023). Hoci tento model nedisponuje klasickými endokrinnými žľazami, molekuly s hormonálnou aktivitou sú produkované rôznymi tkanivami a vysoko konzervované neuroendokrinné dráhy regulujú kľúčové procesy vrátane reprodukcie a starnutia (Zečić a Braeckman, 2020, Mishra *et al.*, 2023, Istiban *et al.*, 2024), pričom sa predpokladá, že steroidné hormóny môžu u hlístovcov plniť obdobné funkcie ako u stavovcov (Gerisch *et al.*, 2007). Na rozdiel od izolovaných buniek zohľadňujú embryá *C. elegans* celkovú odozvu tela na toxické látky, pričom umožňujú presne odhaliť konkrétne molekulárne mechanizmy. *C. elegans* slúži ako hodnotný biologický model na identifikáciu účinkov EDCs s estrogénnym účinkom a môže poskytnúť zásadné poznatky pri hodnotení vplyvu perzistentných organických a environmentálnych znečisťujúcich látok, ktoré sa nachádzajú v mnohých produktoch každodennej potreby (Chen *et al.*, 2019, Moya *et al.*, 2022). Štúdia Nagar *et al.* (2020) hodnotila účinky EDCs na *C. elegans* prostredníctvom expozície parabénom a zistila, že endokrinná disruptívna aktivita viedla k oxidačnému stresu, zmenenej expresii génov a negatívne ovplyvnila rast, správanie a reprodukciu červov. Baumeister *et al.* (2006) ukázali, že molekuly podobné inzulínu, pôsobiace prostredníctvom receptora DAF-2 a transkripčného faktora DAF-16, ovplyvňujú odolnosť organizmu voči oxidačnému stresu a modulujú metabolické dráhy, ktoré majú vplyv na dĺžku života.

Okrem fenotypových pozorovaní účinkov exogénnych látok poskytuje *C. elegans* aj možnosť študovať mechanizmy, ktorými tieto látky ovplyvňujú metabolizmus a životaschopnosť organizmu. Príkladom je štúdia, v ktorej boli testované pesticídy a iné chemikálie na embryonálnu a larválnu životaschopnosť červov. Vedci zistili, že toxicita niektorých zlúčenín bola spojená s indukciou génov kódujúcich cytochróm P450, konkrétne *cyp-35A3* a *cyp-35A4*, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu v metabolizme a detoxikácii xenobiotík. Pomocou RNA interferencie bolo možné tieto gény selektívne potlačiť a ukázať, že ich znížená expresia významne zvyšuje citlivosť červov na chemické látky (Harlow *et al.*, 2016). Podrobnejšie je mechanizmus RNA interferencie umožňujúci skúmať odpoveď *C. elegans* na xenobiotiká rozvinutý v kapitole 2.3.

2.2.1 Testy akútnej toxicity (zamerané na prežívanie nematód)

Tieto testy sa používajú na meranie úhynu nematód, pričom sa sleduje, ako biologický účinok narastá v závislosti od koncentrácie testovanej látky. Metóda spočíva v krátkodobom exponovaní organizmov chemikáliám, ktoré trvá niekoľko hodín pri teplote 20 °C a bez prístupu k potrave. Miera úhynu sa zisťuje vizuálne pod stereomikroskopom tak, že sa po ukončení testu spočíta počet živých a mŕtvych červov. Za uhynutú sa považuje tá nematóda, ktorá sa počas 30-sekundového pozorovania vôbec nehýbe a nereaguje ani na jemný dotyk tenkým platinovým drôtikom (Li *et al.*, 2013, Zhuang *et al.*, 2014, Amrit *et al.*, 2014; Ficociello *et al.*, 2021).

Výsledky týchto testov sú však výrazne ovplyvnené parametrami experimentálneho usporiadania, ako sú použitý kmeň, trvanie expozície, zloženie rozpúšťadla či spôsob hodnotenia úhynu (manuálny alebo automatizovaný), čo znižuje možnosť priameho porovnávania medzi jednotlivými štúdiami. Dostupné štúdie ukazujú, že environmentálne znečisťujúce látky vrátane bisfenolov spôsobujú zníženie prežívania nematód v závislosti od dávky aj času pôsobenia. Pri *C. elegans* sa potvrdilo, že úhyn, spôsobený vystavením BPA, závisí od jeho koncentrácie (García-Espiñeira *et al.*, 2018; Hornos Carneiro *et al.*, 2020), pričom pri súčasnej expozícii BPA a BPS sa zaznamenal jej synergický nárast (Zhou *et al.*, 2016; Hamamba *et al.*, 2020).

Hoci je vo väčšine prípadov pozorovaný jednoznačný vzťah medzi dávkou a účinkom, mnohé štúdie pracujú s koncentraciami presahujúcimi úroveň bežne sa vyskytujúce v životnom prostredí, čo môže obmedzovať prenos týchto poznatkov na hodnotenie rizík pre ľudské zdravie. Úhyn vyvolaný bisfenolmi je úzko spätý so zvýšeným oxidačným stresom, poruchami mitochondriálnych funkcií a postupným hromadením bunkového poškodenia. Súhra týchto procesov narušá detoxikačné a reparačné mechanizmy organizmu a v konečnom dôsledku vedie k jeho zániku.

2.2.2 Testy rýchlosti rastu a vývinu

Využitie modelového organizmu *C. elegans* predstavuje efektívny nástroj na štúdium vplyvu xenobiotík na rast a vývin. Jednoduchý životný cyklus, transparentnosť a nenáročná kultivácia týchto hlístovcov umožňuje detailné sledovanie zmien v raste prostredníctvom softvérovej analýzy obrazu (Peng *et al.* 2007, Mathew *et al.*, 2012). Hoci mnohé štúdie potvrdzujú negatívny vplyv látok ako BPA, BPS (Zhou *et al.*, 2016, Xiao *et al.*, 2019, Hyun *et al.*, 2021, Kucharíková *et al.*, 2023, Kaiglová *et al.*, 2025) či TBBPA (Liu *et al.*, 2020a) na

dĺžku tela nematód, v odbornej literatúre sa objavujú aj protichodné zistenia naznačujúce nárast dĺžky po expozícii BPA (García-Espiñeira, 2018), čo možno pripísať variabilite v experimentálnych podmienkach, ako sú koncentrácia látok, dĺžka expozície, vývinové štádium či konkrétny kmeň organizmu. Komplexnosť tejto problematiky dopĺňa aj hodnotenie vplyvu sledovaných látok na jednotlivé larválne štádiá *C. elegans* alebo tvorbu dospelých lariev ako indikátorov stresu (Wang *et al.*, 2010). Aj keď sa účinky často líšia v závislosti od dávky, väčšina štúdií používa koncentrácie bisfenolov vyššie, než sú bežné v reálnom prostredí. Preto je potrebné tieto výsledky hodnotiť s ohľadom na skutočné environmentálne a ľudské expozície. Poruchy rastu a vývinu sú pravdepodobne spôsobené oxidačným stresom vyvolaným bisfenolmi, narušením metabolických procesov a zmenami v hormonálnej regulácii rastu. Spolu tieto mechanizmy ovplyvňujú delenie buniek, energetickú rovnováhu a telesný vývin.

2.2.3 Test reprodukcie a sledovanie dĺžky života

Schopnosť reprodukcie predstavuje kľúčový parameter pri posudzovaní potenciálneho účinku endokrinných disruptorov. V tomto ohľade je *C. elegans* mimoriadne vhodným modelovým organizmom najmä vďaka svojmu vysoko diferencovanému, no štrukturálne jednoduchému reprodukčnému systému. Je známe, že tieto nematódy sú prevažne hermafrodity, u ktorých sa spermie aj oocyty vyvíjajú postupne v spoločnej gonáde (Davis *et al.*, 2023). Na skúmanie vplyvu environmentálnych polutantov na reprodukciu *C. elegans* využívajú výskumníci rôzne metodické prístupy. Bežnou stratégiou je porovnanie veľkosti a počtu potomstva produkovaného exponovanými jedincami s kontrolnou skupinou. Tento cieľ možno dosiahnuť prenesením exponovaných dospelých červov na Petriho misku a následným sčítaním všetkých vyliahnutých potomkov (Wang *et al.*, 2019a). Alternatívne možno mieru fertility odhadnúť na základe celkového počtu lariev prítomných v závere experimentu. Ďalším indikátorom reprodukčného zdravia je správanie pri kladení vajíčok, ktoré sa stanovuje umiestnením dospelých jedincov na nové Petriho misky a sčítaním počtu vajíčok nakladených za presne stanovený časový úsek (Ha *et al.*, 2022). Ukázalo sa, že expozícia mnohým endokrinným disruptorom, ako sú BPA, BPS a tetrachlórbisfenol A (TCBPA), vedie k zníženiu produkcie a narušeniu vývinu potomstva, zmenšeniu veľkosti znášky a k nárastu embryonálnej či larválnej letality (Chen *et al.*, 2016b, Yu *et al.*, 2022, Hornos Carneiro *et al.*, 2020). Tieto reprodukčné deficity sú mechanisticky podmienené poškodením DNA v dôsledku oxidačného stresu, narušením segregácie meiotických chromozómov a aktiváciou apoptózy v zárodočných líniách, čo sú procesy, ktoré v ko-

nečnom dôsledku ohrozujú životaschopnosť embryí. Treba však poznamenať, že mnohé štúdie pracujú s vysokými koncentráciami bisfenolov prevyšujúcimi bežnú environmentálnu expozíciu, čo môže pozorované efekty zvýrazňovať. Hodnotenie dĺžky života predstavuje ďalší efektívny prístup k skúmaniu vplyvu endokrinných disruptorov na *C. elegans*. Dĺžka života nematódy je tradične definovaná ako obdobie od larválneho štádia L4 až po úhyn jedinca. Pri sledovaní tohto javu vedci vystavujú červy v štádiu L4 účinku testovanej chemikálie a priebežne monitorujú ich prežívanie. Nematódy sú rutinne prenášané na čerstvé kultivačné misky so zdrojom potravy a prídavkom 5-fluórdeoxyuridínu, ktorý slúži na inhibíciu reprodukcie. Miera prežitia sa následne vypočíta ako podiel živých jedincov k ich celkovému počtu (Park *et al.*, 2017, Wang *et al.*, 2019b). Nedávne štúdie naznačujú, že expozícia *C. elegans* vybraným endokrinným disruptorom vrátane BPA, BPF, BPS a TMBPF signifikantne skracaie dĺžku ich života (Xiao *et al.*, 2019, Hyun *et al.*, 2021). Tento pokles je zjavne spojený so zrýchlenou akumuláciou molekulárneho poškodenia, pretrvávajúcou redoxnou nerovnováhou a narušenou proteostázou, z čoho vyplýva, že expozícia bisfenolom prispieva k predčasnému funkčnému úpadku a k prejavom fenotypov súvisiacich so starnutím.

2.2.4 Transgeneračné a multigeneračné testy

Pojmy „transgeneračná a multigeneračná toxicita“ označujú škodlivé účinky environmentálnych polutantov, ktoré sa prejavujú nielen u priamo exponovanej generácie, ale aj u jej potomstva (Kim *et al.*, 2018, Zhao Y. *et al.*, 2023). Vďaka krátkemu životnému cyklu a vysokej fekundite predstavuje *C. elegans* vysoko efektívny modelový organizmus pre tento typ štúdií (Zhao Y. *et al.*, 2023). Dostupné údaje naznačujú, že expozícia BPA môže negatívne ovplyvňovať reprodukciu nematód naprieč generáciami, čo je potenciálne sprostredkované dereguláciou represívnych modifikácií histónov (Camacho *et al.*, 2018). V podobnom zmysle vyvoláva expozícia BPS transgeneračné behaviorálne a vývinové zmeny, ktoré zahŕňajú zníženú frekvenciu pohybov hlavy („head thrashes“) (Xiao *et al.*, 2019), skrátenie dĺžky tela potomstva a pokles reprodukcie počas viacerých generácií (Xiao *et al.*, 2019, McDonough *et al.*, 2021). Podobne aj TBBPA vykazuje transgeneračnú toxicitu, ktorá sa prejavuje zníženou lokomočnou aktivitou (Liu *et al.*, 2020a), skrátením dĺžky života a nižšou mierou prežitia v priebehu troch generácií (Liu *et al.*, 2023b). Tieto multigeneračné efekty sú pravdepodobne dôsledkom kumulatívneho oxidačného stresu, poškodenia DNA a epigenetických modifikácií, ktoré v následných generáciách narušujú neuronálne funkcie, reprodukciu a celkový vývin.

Je však potrebné zdôrazniť, že metodologické rozdiely vrátane počtu sledovaných generácií, načasovania expozície, výberu kmeňa či kultivačných podmienok môžu viesť k variabilným výsledkom medzi jednotlivými laboratóriami.

2.2.5 Testy neurotoxicity

C. elegans predstavuje široko využívaný model na posudzovanie neurotoxických účinkov environmentálnych polutantov, pričom lokomócia (pohybová aktivita) slúži ako citlivý indikátor neurónových funkcií. Vzhľadom na to, že fungovanie neurónov je vysoko závislé od energetickej rovnováhy a redoxnej homeostázy, predstavuje neurotoxická často jeden z najskorších a najcitlivejších funkčných prejavov bunkového stresu indukovaného bisfenolmi.

Behaviorálne testy zvyčajne merajú frekvenciu pohybov hlavy, rýchle ohyby tela alebo sínusovité vlnenie tela (Wang a Xing, 2008, Zheng *et al.*, 2022, Wang *et al.*, 2023). V týchto testoch sa bežne využívajú synchronizované mladé dospelé jedince. Červy sa prenášajú do tekutého média na testy plávania/kmitania (Buckingham a Sattelle, 2009), alebo sa analyzujú priamo na agarových platniach pri testoch ohýbania tela (Petratou *et al.*, 2023). Spravidla sa meria 10 – 20 červov na jednu replikáciu, aby sa zabezpečila štatistická spoľahlivosť (Hering a Mikecz, 2022). Alternatívny test spočíva v počítaní imobilných jedincov (Liu *et al.*, 2022). Testy lokomócie môže vyhodnocovať pozorovateľ manuálne alebo automaticky pomocou sledovacieho softvéru (Buckingham a Sattelle, 2009, Zhang *et al.*, 2022).

Expozícia environmentálnym polutantom, ako sú BPA, BPS, TBBPA a TCBPA, signifikantne znižuje lokomočnú aktivitu (Zhou *et al.*, 2016, Xiao *et al.*, 2019, Liu *et al.*, 2020b, Wang *et al.*, 2023, Zhao K. *et al.*, 2023, Yu *et al.*, 2024).

Chemotaxia (schopnosť organizmu reagovať pohybom na chemické podnety) je pre *C. elegans* životne dôležitý proces, ktorý je nevyhnutný na vyhľadávanie potravy a partnera, kladenie vajíčok, tvorbu dauerových lariev, ako aj na vyhýbanie sa patogénom a toxínom. Testy chemotaxie spoľahlivo vyhodnocujú behaviorálne reakcie na chemické podnety. V konvenčnom usporiadaní experimentu sú červy rovnomerne rozmiestnené medzi testovanú a kontrolnú látku, ktoré sú umiestnené na opačných stranách Petriho misky. Ak je testovaná látka pre hlístovce atraktívna, majú tendenciu presúvať sa do oblastí s jej výskytom. Naopak, ak ich odpudzuje, červy sa od nej vzdalujú, čo vedie k vyššej koncentrácii jedincov na kontrolnej strane v porovnaní s testovacou stranou. Vďaka tomuto prístupu môžu výskumníci študovať a merať chemotaktické reakcie *C. elegans* na rôzne environmentálne podnety. Okrem analýzy príťažli-

vosti alebo odpudivosti môžu vedci určovať aj preferenčné správanie medzi dvoma odlišnými zlúčeninami. To sa dosahuje súčasným zavedením dvoch unikátnych atraktantov na opačné strany Petriho misky (namiesto kombinácie atraktantu a kontroly). Na základe distribúcie červov sa následne vypočíta index chemotaxie (CI) – parameter, ktorý uľahčuje porovnávacie vyhodnotenie chemotaktickej reakcie na každú z možností. Ukázalo sa, že tento prístup poskytuje významné poznatky o preferenciách nematód (Margie *et al.*, 2013, Hopewell *et al.*, 2017, Crombie *et al.*, 2022).

Hltan (farynx) *C. elegans* vykazuje pumpovaciu aktivitu, ktorá je analogická činnosti cicavčieho srdca a slúži ako kľúčový indikátor potravinového správania. Testy pumpovania hltana kvantifikujú toto správanie počítaním počtu kontrakcií hltana v definovanom časovom intervale, pričom sa často využívajú vekovo synchronizované nematódy, aby sa zabezpečila jednotnosť vzhľadom na ich veľkosť a vývinové štádium (Ijomone *et al.*, 2021, Gaur a Agarwal, 2021). Alternatívne metódy merajú spotrebu potravy prostredníctvom zmien hustoty bakteriálnej suspenzie (Boyd *et al.*, 2007, Tejeda-Benitez *et al.*, 2016) alebo ingescie fluorescenčných mikropartikul (Boyd *et al.*, 2007). Látky ako BPA a TBBPA značne znižujú mieru faryngeálneho pumpovania (Liu *et al.*, 2020a, Tan *et al.*, 2015, Kohra *et al.*, 2002).

2.2.6 Testy oxidačného stresu a poškodenia DNA

Oxidačný stres, vznikajúci v dôsledku nerovnováhy medzi produkciou reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a antioxidačnou obranou organizmu, predstavuje bežný mechanizmus toxicity indukovanej environmentálnymi polutantmi. Zvýšené hladiny ROS môžu spôsobiť závažné poškodenie proteínov, lipidov a predovšetkým DNA, čo u *C. elegans* vedie k pozorovateľným fenotypovým zmenám, ako sú znížená pohyblivosť, skrátenie dĺžky tela a narušený vývin potomstva. V dôsledku toho sa zdá, že oxidačný stres tvorí centrálny primárny mechanizmus (tzv. „upstream pathway“), prostredníctvom ktorého bisfenoly sprostredkovávajú toxické účinky na ďalšie sledované parametre vrátane oneskorenia vývinu, neurobehaviorálnych dysfunkcií, reprodukčných porúch, apoptózy a skrátenia dlhovekosti.

Ako dokumentuje dostupná literatúra, na meranie oxidačného stresu u nematód existuje niekoľko rôznych metód: ide napríklad o meranie autofluorescencie lipofuscínu alebo využitie fluorescenčných farbív, ako je 2',7'-dichlórofluoresceín diacetát. Okrem toho qPCR analýza GFP reportérov indukovaných génmi reagujúcimi na oxidačný stres ponúka hlbší pohľad na celulárnu odpoveď (Zhou *et al.*, 2016, Yu *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2023).

Bolo dokázané, že expozícia environmentálnym kontaminantom vedie k signifikantnému poškodeniu DNA. Na skúmanie týchto účinkov u *C. elegans* možno využiť qPCR, kometový test (comet assay) a transgénne kmene obsahujúce reportéry poškodenia a opravy DNA (Wang *et al.*, 2023, Yu *et al.*, 2020, Imanikia *et al.*, 2016).

Predchádzajúce štúdie doložili, že BPA môže u *C. elegans* vyvolávať oxidačný stres vedúci k zvýšeniu hladín ROS, čo následne inhibuje opravu dvojlákových zlomov DNA počas meiózy. Tento proces negatívne ovplyvňuje reprodukciu, nervový systém (Allard *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2023; Bradford *et al.*, 2020) a urýchľuje proces starnutia (Zhou, 2018). BPA môže u *C. elegans* taktiež spôsobovať chromozomálne abnormality a dvojlákové zlomy v meiotickej DNA (Shin *et al.*, 2019). Analogické účinky boli pozorované aj pri BPS (Xiao *et al.*, 2019) a TBBPA (Yang Y., 2024).

2.2.7 Testy apoptózy

Apoptóza sa u *C. elegans* bežne posudzuje vyhodnocovaním bunkovej morfológie a fragmentácie DNA s využitím fluorescenčných farbív alebo transgénnych kmeňov. Rozšírenou technikou v tejto oblasti je použitie akridínovej oranže, čo je vitálne farbivo s jasne zelenou fluorescenciou, ktoré má schopnosť prenikať do bunkového jadra (Qu *et al.*, 2019). Počas experimentu sa nematódy po expozícii toxikantu ponoria na dve hodiny do roztoku akridínovej oranže, čím sa zabezpečí efektívna absorpcia farbiva. Po následnej stabilizácii červov na Petriho miske možno identifikovať apoptotické bunky pomocou invertovaného fluorescenčného mikroskopu pri špecifických excitačných a emisných vlnových dĺžkach. Apoptotické bunky vykazujú zvýšenú fragmentáciu DNA, čo je sprevádzané charakteristickou žltou až žltó-oranžovou fluorescenciou, zatiaľ čo zdravé bunky si zachovávajú pôvodné zelené sfarbenie (Zhou *et al.*, 2016).

Alternatívnou technikou je využitie fluorescenčného farbiva SYTO12, ktoré sa na *C. elegans* aplikuje počas 1,5 hodiny pri izbovej teplote. Po zafarbení sa nematódy prenesú na kultivačné NGM misky s baktériami *E. coli* OP50 na 30 minút, aby sa odstránili zvyšky farbiva. Apoptotické bunky sa následne identifikujú fluorescenčným mikroskopom s červeným filtrom (Germoglio *et al.*, 2022).

Pri výskume zameranom na smrť zárodočných buniek sa s úspechom využívajú transgénne kmene exprimujúce *ced-1*, ktorý kóduje transmembránový proteín nevyhnutný na pohlcovanie mŕtvych buniek (tzv. „cell corpses“). Tento prístup poskytuje v porovnaní s farbením akridínovou oranžou presnejšie výsledky (Bradford *et al.*, 2020).

Bolo zistené, že expozícia bisfenolom vrátane BPA, BPF, BPS, BPY, BPZ a TBBPA signifikantne zvyšuje fragmentáciu DNA a mieru apoptózy (Ficociello *et al.*, 2021, Zhou *et al.*, 2016, Roberts *et al.*, 2022, Liu *et al.*, 2023b), pričom pri kombinovanej expozícii viacerým látkam boli pozorované synergické účinky (Hamamba *et al.*, 2020, Moreman *et al.*, 2017).

Apoptóza funguje ako mechanistický mediátor, ktorý prepája oxidačný stres a poškodenie DNA s funkčnými dôsledkami, ako sú reprodukčná toxicita, neurobehaviorálne deficity a skrátená dĺžka života. Variabilitu výsledkov môžu ovplyvňovať rozdiely v použitých reportérových kmeňoch, protokoloch farbenia či dĺžke expozície. Podobne ako pri iných sledovaných parametroch, aj tu platí, že vysoké koncentrácie bisfenolov bežne využívané v experimentoch môžu vyvolať výraznejšiu apoptotickú odpoveď v porovnaní s hladinami vyskytujúcimi sa v životnom prostredí.

2.3 *C. elegans*, objav a využitie RNA interferencie (RNAi)

Zatiaľ čo vyššie opísané metodiky (2.2.3 – 2.2.7) poskytujú dôležité údaje o toxickom vplyve bisfenolov na fyziológiu jedinca, na presné určenie genetických dráh zodpovedných za tieto účinky je nevyhnutné využiť nástroje molekulárnej biológie. Objav RNAi u *C. elegans* priniesol vedcom revolučnú možnosť cielene vypínať vybrané gény a skúmať ich podiel na odolnosti alebo citlivosti organizmu voči environmentálnym stresorom.

Proces prenosu genetickej informácie z DNA do funkčných molekulárnych produktov je realizovaný prostredníctvom génovej expresie. Tento proces sa iniciuje transkripciou, počas ktorej sa na základe templátu DNA syntetizuje molekula mediátorovej (messengerovej) RNA (mRNA). Následne dochádza k translácii, pri ktorej je informácia nesená mRNA využitá na syntézu proteínu, pričom samotná syntéza prebieha na ribozómoch, ktoré zabezpečujú zostavovanie aminokyselín do polypeptidového reťazca. Celá táto cesta od génu k proteínu (génová expresia), musí byť prísne riadená komplexnými regulačnými mechanizmami. Ich úlohou je zabezpečiť, aby boli špecifické gény aktivované (exprimované) len v požadovaných bunkách a v optimálnom čase.

Medzi kľúčové regulačné mechanizmy patrí (okrem iného) aj RNAi. Tento proces má významnú rolu v regulácii mnohých bunkových aktivít vrátane bunkového cyklu, bunkovej diferenciácie, programovanej bunkovej smrti (apoptózy), vývinu organizmu (ontogenézy), vzniku istých neurologických porúch, či malignej transformácie.

RNAi je mechanizmus selektívneho posttranskripčného utlmenia génovej expresie, ktorý je sprostredkovaný špecifickými dvojvláknovými molekulami

RNA (dsRNA) (Fire *et al.*, 1998). Po štiepení dsRNA enzýmom Dicer vznikajú krátke RNA fragmenty, ktoré sa začleňujú do RNA-indukovaného silenčného komplexu (RISC) a rozpoznávajú cieľovú mRNA na základe sekvenčnej komplementarity. V závislosti od pôvodu a charakteru týchto fragmentov rozlišujeme dva hlavné typy malých RNA: siRNA a miRNA (Doench *et al.*, 2003). Krátke interferujúce siRNA zvyčajne vznikajú z exogénnej alebo endogénnej dsRNA a viažu sa takmer dokonale komplementárne k cieľovej mRNA, čo vedie k jej priamej degradácii a silnému utlmeniu génu (Hutvagner a Zamore, 2006). Naproti tomu miRNA sú endogénne kódované RNA molekuly dlhé cca 22 nukleotidov (Ying a Lin, 2005), ktoré sa viažu prevažne na čiastočne komplementárne sekvencie v 3' neprekladanej oblasti mRNA a spôsobujú prevažne inhibíciu translácie alebo destabilizáciu mRNA, čím jemne modulujú expresiu génu (Gregory a Shiekhattar, 2005). V *C. elegans* tieto dva režimy RNAi umožňujú nielen efektívne umlčanie cudzorodej RNA, ale aj precíznú reguláciu endogénnych génov, čo je kľúčové pre vývinové procesy a adaptívne reakcie buniek.

Objav RNAi zásadne zmenil chápanie regulácie génovej expresie u eukaryotov a je úzko spätý s výskumom na modelovom organizme *C. elegans*. Za objav RNAi ako mechanizmu sekvenčne špecifického umlčania génov sprostredkovaného dsRNA získali v roku 2006 Andrew Fire a Craig Mello Nobelovu cenu za fyziológiu alebo medicínu. Vo svojich experimentoch na *C. elegans* dokázali, že zavedenie krátkej dsRNA vedie k účinnej degradácii cieľovej mRNA. Tento jednoduchý a geneticky dobre charakterizovaný organizmus umožnil jasne demonštrovať existenciu prirodzeného, evolučne konzervovaného mechanizmu regulácie génovej expresie, ktorý sa uplatňuje aj v obrane proti cudzorodej RNA (Fire *et al.*, 1998).

Na tieto zistenia nadväzujú práce Victora Ambrosa a Garyho Ruvkuna, ktorí pri štúdiu vývinového časovania u *C. elegans* objavili miRNA ako novú triedu regulačných molekúl. Identifikácia miRNA *lin-4* a neskôr evolučne konzervovanej *let-7* ukázala, že malé nekódujúce RNA zohrávajú kľúčovú úlohu v posttranskripčnej regulácii génovej expresie (Ambros a Horovitz, 1987, Lee *et al.*, 1993). Za objav miRNA a objasnenie ich biologickej funkcie získali Ambros a Ruvkun Nobelovu cenu za fyziológiu alebo medicínu v roku 2024.

RNAi predstavuje u *C. elegans* mimoriadne efektívny biologický mechanizmus, pri ktorom prítomnosť dsRNA spúšťa cieleňú degradáciu mRNA, čím dochádza k umlčaniu konkrétnych génov. Tento modelový organizmus je v genetike kľúčový najmä vďaka schopnosti prijímať dsRNA priamo z potravy (napr. prostredníctvom bakteriálneho kmeňa *E. coli* obsahujúcom plazmid, ktorý kóduje dsRNA) (Timmons *et al.*, 2001), po čom sa efekt tlmenia génov šíri systémovo do celého tela a dokáže sa prenášať aj na ďalšie generácie

(Whangbo a Hunter, 2008). Vďaka tejto prirodzenej systémovosti a dedičnosti slúži RNAi ako štandardný nástroj na funkčnú analýzu génov, umožňujúci jednoduché skúmanie ich úloh v organizme bez potreby zložitej genetickej manipulácie.

3. POROVNANIE BIOLOGICKÝCH ÚČINKOV *C. ELEGANS* PO EXPOZÍCIÍ BPA A JEHO SUBSTITÚTOM (VLASTNÝ VÝSKUM)

V práci Kaiglová *et al.* (2025) sme hodnotili účinok rôznych koncentrácií bisfenolu A (BPA) a jeho alternatív – bisfenolu S (BPS), bisfenolu F (BPF) a bisfenolu AF (BPAF) – na vybrané biologické charakteristiky (hatchabilita/liahnivosť, habituačné správanie a rast) nematódy *C. elegans*, pričom sme ich porovnávali s neexponovanou kontrolnou skupinou (Kaiglova, *et. al.*, 2025). V štúdií Kucharíková *et al.* (2023) sme sa (okrem iného) rozhodli preskúmať, či by mutácia v géne *C. elegans bli-1* (ktorý kóduje jeden z mnohých kutikulárnych kolagénov u hlístovcov), mohla zohrávať úlohu pri indukovaní nežiaducich účinkov BPA a jeho často použíwanej náhrady BPS.

V rámci našich nepublikovaných dát sme sa ďalej zamerali na hodnotenie účinkov bisfenolov (BPA, BPS, BPF, BPAF v koncentráciách 0,5; 1,0 a 5,0 μM) na ďalšie mutantné kmene *C. elegans* s utlmenými génmi podieľajúcimi sa na tvorbe kutikuly. Do analýzy sme zaradili mutanty *rol-1*, *rol-6*, ktoré majú utlmené rovnomenné gény kódujúce špecifické kutikulárne kolagény ovplyvňujúce štruktúru a mechanické vlastnosti kutikuly, ako aj mutant *sqt-1* so zníženou expresiou génu zodpovedného za správnu organizáciu a stabilitu kolagénových vlákien. Okrem týchto mutantov sme do štúdie zahrnuli aj nemutovaný kmeň *C. elegans* Bristol (N2, „wild type“ – WT).

V tejto štúdií sme vyhodnocovali parametre ako liahnivosť, habituáciu na predné dotykové podnety a frekvenciu ohybov tela po expozícii embryí nematód vybraným typom bisfenolov.

3.1 Materiál a metódy

3.1.1 Príprava kultivačných platní a kultivácia *C. elegans*

Kmeň *C. elegans* var. Bristol N2 („wild type“ - WT) sme zakúpili od spoločnosti Carolina Biological Supply Company, New York, USA. Mutantné kmene *bli-1*, *rol-1*, *rol-6* a *sqt-1* sme získali od Caenorhabditis Genetics Center (CGC), University of Minnesota, Minnesota, USA. Hlístovce sme kultivovali na platniach s médiom pre rast nematód (NGM), čo umožnilo jednoduchú kultiváciu a nenáročné udržiavanie červov v laboratórnych podmienkach. Platne NGM

boli naočkované mutantným laboratórnym kmeňom baktérie *E. coli* OP50. Túto baktériu, ktorá je auxotrofná na uracil, sme zvolili ako zdroj potravy pre nematódy, pretože jej obmedzený rast na platniach s NGM zjednodušuje následné pozorovanie hlístovcov. Platne s NGM boli pripravené podľa protokolu Merrow a Olmeda (2014). Najprv sa pripravil základný zásobný roztok zmiešaním 3 g NaCl, 17 g agaru, 2,5 g peptónu a 975 ml destilovanej vody. Po autoklávaní a ochladení na 55 ° C vo vodnom kúpeli boli asepticky pridané sterilné doplnkové roztoky: 1 ml 1 M CaCl_2 , 1 ml cholesterolu v etanole (5 mg/ml), 1 ml 1 M MgSO_4 a 25 ml 1 M KPO_4 . Pripravené médium sa následne nalialo do sterilných Petriho misiek, kde sa nechalo stuhnúť pri izbovej teplote v laminárnom boxe.

Na získanie embryí *C. elegans* sme použili metódu s bielidlom, podľa protokolu Porta-de-la-Riva (2012). Táto metóda je založená na selektívnej lýze a usmrtení všetkých vývinových štádií nematód okrem vajíčok, ktoré sú pred účinkami roztoku chránené svojou mimoriadne odolnou škrupinkou. Pre správny postup tejto metódy je potrebná populácia, ktorá je aspoň trojdenná (dospelé jedince schopné klásť vajíčka), a preto sme približne 72 h pred plánovanou synchronizáciou preočkovali nematódy zo starej platne na novú NGM pôdu s kmeňom *E. coli* OP50.

Všetky vývinové štádiá červov (vrátane vajíčok/embryí) sa zmyli z NGM platne pufrovaným roztokom M9 (5,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g KH_2PO_4 , 5,0 g NaCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rozpustených v 1 l destilovanej vody) a preniesli sa do sterilnej skúmavky. Po centrifugácii (1 min, 1400 RCF) bol supernatant odstránený a k peletu sa pridal na 5 min. čerstvo pripravený roztok bielidla (8,25 ml sterilnej destilovanej vody, 3,75 ml 1M NaOH a 3 ml SAVA) s cieľom zničiť všetky vývinové štádiá okrem vajíčok. Po krátkom premiešaní a vortexovaní bol pelet opäť centrifugovaný a supernatant sa čo najrýchlejšie odstránil, aby sa predišlo zbytočne dlhej expozícii roztoku bielidla, ktorá by mohla pri dlhšom pôsobení poškodiť aj vajíčka. Následne bol pelet trikrát premytý roztokom M9 na odstránenie zvyškového bielidla a uhynutých červíkov, pričom zostali len vajíčka nematód.

3.1.2 Príprava roztokov bisfenolov

Na experimenty sa použili vysoko čisté bisfenoly: BPA (4,4'-izopropylidén-difenol, 97 %) a BPS (4,4'-sulfonyldifenol, 99,7 %) od spoločnosti Acros Organics (divízia Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgicko), ako aj BPF (4,4'-metyléndifenol, 98,0 %) a BPAF (4,4'-hexafluorizopropylidéndifenol, 99 %) od Sigma-Aldrich Intl GmbH, Buchs SG, Švajčiarsko. Z týchto látok sa pripravili

zásobné roztoky s koncentráciou 100 μM v 10 % etanolovom roztoku. Zo zásobných roztokov sa následne pripravili pracovné roztoky zriedením v S-pufri (129 ml 0,05 M K_2HPO_4 , 871 ml 0,05 M KH_2PO_4 a 5,85 g NaCl) s konečnými koncentraciami 0,5; 1 a 5 μM podľa už skôr publikovaného protokolu (Mersha *et al.*, 2015).

Keďže bisfenoly sa zle rozpúšťajú, na urýchlenie ich rozpúšťania sa použil ultrazvukový homogenizátor (sonikátor). Zásobné roztoky sa sonikovali 15 minút pri 37 °C. Kontrolné skupiny červov boli exponované len samotnému S-pufri.

3.1.3 Stanovenie vplyvu bisfenolov na liahnivosť

Embryá *C. elegans* pripravené v predchádzajúcom kroku boli exponované jednotlivým koncentráciám (0,5; 1,0 a 5 μM) BPA, BPS, BPAF a BPF počas 4 hodín pri 20 °C za jemného pretrepávania na trepačke Titramax 1000. Po uplynutí tohto expozičného času bolo nutné vykonať dôkladné premývanie roztokom „S-Basal“ (2,925 g NaCl , 0,5 g K_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 sme rozpustili v 493,575 ml destilovanej vody a následne sme roztok sterilizovali v autokláve 20 minút pri 121 °C). Do všetkých exponovaných vzoriek sme potom pridali 500 ml roztoku „S-Basal“ na premytie. Táto suspenzia bola vždy dôkladne premiešaná na vortexe a opäť centrifugovaná. Kroky od pridania roztoku „S-Basal“ až po opätovnú centrifugáciu sme opakovali celkovo trikrát, aby sme minimalizovali množstvo zvyškového bisfenolu. Po poslednej centrifugácii bol výsledný supernatant opatrne odsatý tak, aby v mikroskúmavke zostalo približne 100 ml suspenzie „S-Basal“ a embryí. Po dôkladnom premiešaní na vortexe sme 25 ml suspenzie (cca 50 červov) preniesli na príslušné označené platne naočkované kmeňom *E. coli* OP50 a inkubovali 18 hodín pri 20 °C. Počet vyliahnutých nematód bol zdokumentovaný pomocou stereomikroskopu a zaznamenaný.

3.1.4. Stanovenie vplyvu bisfenolov na habituáciu na predné dotykové podnety *C. elegans*

Po 48 hodinách sme vyhodnotili habituačné správanie hlístovcov *C. elegans*, ktoré boli predtým vystavené rôznym koncentráciám bisfenolov (podľa postupu opísaného v časti „Stanovenie vplyvu bisfenolov na liahnivosť“). Rovnaké hodnotenie sme vykonali aj u kontrolných jedincov. Hodnotenie bolo realizované podľa postupov, uvedených v štúdiách Mersha *et al.* (2015 a 2018).

Pokus sme uskutočnili pomocou dotykových stimulov v prednej časti tela červa pomocou sklenenej tyčinky s prilepenou umelou riasou, čo predstavovalo ideálnu voľbu z hľadiska požadovanej jemnosti dotyku. Pod stereomikroskopickou kontrolou sme stimulovali nematódy opakovaným dotykcom. Stimuly boli aplikované na približne rovnaký bod v hlavovej oblasti v 5-sekundových interstimulačných intervaloch. Na prvé podnety reagovali hlístovce rýchlym pohybom dozadu. Pri pokuse sme zaznamenávali počet dotykov potrebných na habituáciu (t. j. na to, aby si červy zvykli, prestali na podnet reagovať a pokračovali v pohybe dopredu).

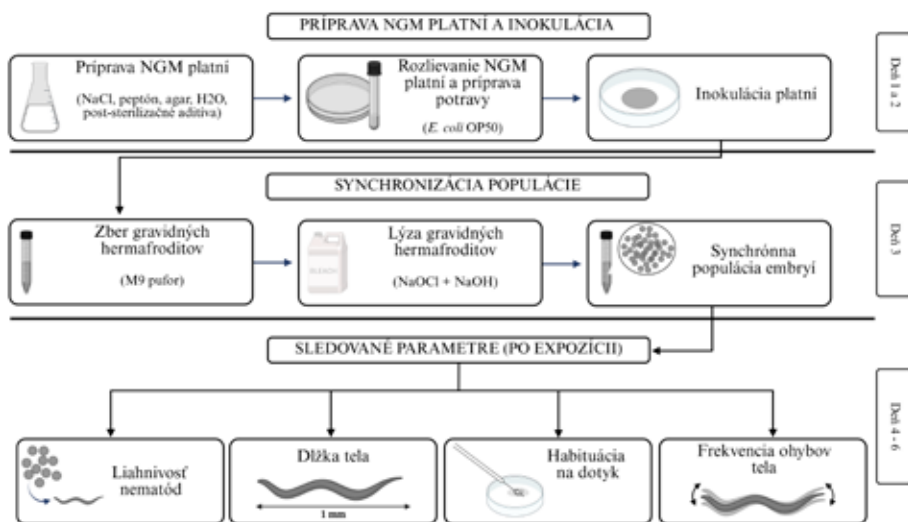
3.1.5 Stanovenie vplyvu bisfenolov na dĺžku tela *C. elegans*

Larvy *C. elegans* (inkubované pri 20 °C po dobu 18 hodín) boli pomocou preparačnej ihly prenesené na mikroskopické podložné sklíčka. Usmrtenie živočíchov sa dosiahlo zahriatím sklíčok nad plameňom. Navyše, telá takto usmrtených hlístovcov sa v dôsledku tepla vystreli. Analýza dĺžky tela tepelne usmrtených *C. elegans* bola vykonaná pomocou mikroskopu NIKON Eclipse 200, ktorý bol prepojený s počítačom so softvérom pre metrické meranie.

3.1.6 Stanovenie vplyvu bisfenolov na lokomotorickú aktivitu *C. elegans*

Lokomotorická aktivita *C. elegans* bola hodnotená pomocou manuálneho počítania ohybov tela („body bends“). Pre každý experimentálny stav bolo analyzovaných minimálne 20 jedincov, vybraných náhodne z nezávislých populácií. Jedince boli prenesené do 100 µl M9 tlmivého roztoku na podložnom sklíčku. Následne im bol poskytnutý časový interval jednej minúty na aklimatizáciu v novom prostredí. Po uplynutí tejto doby bol pohyb červa zaznamenaný digitálnou kamerou počas definovaného časového úseku (30 sekúnd). Následná analýza videozáznamov prebiehala v softvérovom prostredí VLC media player s využitím funkcie redukovanej rýchlosti prehrávania 0,25-krát, čo umožnilo presnú vizuálnu detekciu jednotlivých pohybových fáz a elimináciu chýb spôsobených rýchlym pohybom nematód. Do hodnotiaceho súboru boli zaradené výhradne vitálne jedince vykazujúce kontinuálny pohyb, ktoré počas stanoveného časového intervalu neopustili zorné pole. Jeden ohyb bol definovaný ako dosiahnutie krajnej polohy hlavy na jednej strane osi tela. Zaznamenávala sa každá zmena smeru pohybu, teda samostatne ohyb vľavo a samostatne ohyb vpravo, nie iba celé pohybové cykly. Frekvenciu pohybu

sme vypočítali z celkového počtu ohybov (N) a času (t) podľa vzorca $f \text{ (Hz)} = N / (2t)$, keďže jeden úplný pohybový cyklus sa skladá z dvoch ohybov (tam a späť). Pre účely porovnania sme túto hodnotu následne previedli na pohyby za minútu, označované ako BPM („Body Bends per Minute“), podľa vzťahu $BPM = f \times 60$. Časová postupnosť prípravy synchronnej populácie a analýzy fenotypových prejavov *C. elegans* je znázornená na Obr. 2.



Obr. 2: Schéma experimentálneho dizajnu a časový harmonogram

3.1.7 Štatistická analýza

Pre štatistickú analýzu sa použil štatistický program R-Project verzia 4.0.3. Dáta boli normalizované a overené pomocou Shapirovho-Wilkovho testu (Shapiro test). Štatistická významnosť bola posúdená pomocou parametrického t-testu a neparametrického Wilcoxonovho testu. Výsledky sa považovali za významné, ak $p \leq 0,05$. V rámci dosiaľ nepublikovaných výsledkov bola rovnosť variácií dát overená pomocou Leveneho testu a normalita údajov posudzovaná Shapirovým-Wilkovým testom. Na porovnanie jednotlivých skupín bol použitý Wilcoxonov test.

4. VÝSLEDKY

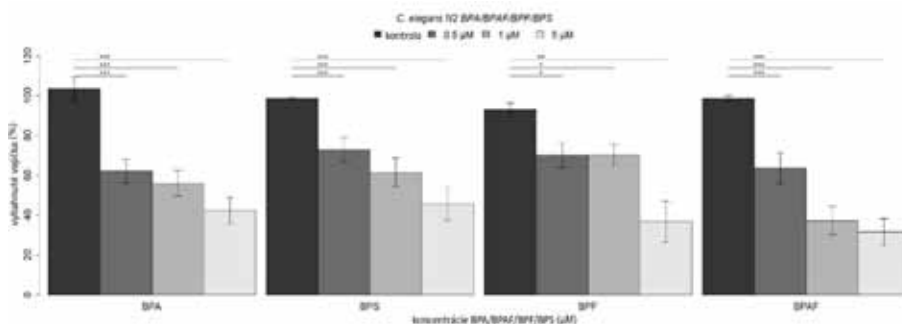
Výsledky našich predchádzajúcich štúdií, ako aj predbežné, doposiaľ nepublikované údaje poukazujú na významné zmeny v liahnivosti, habituácii, raste a motilitate nematód *C. elegans* po expozícii BPA a jeho náhradám v porovnaní s kontrolnou skupinou.

4.1 Výsledky liahnivosti

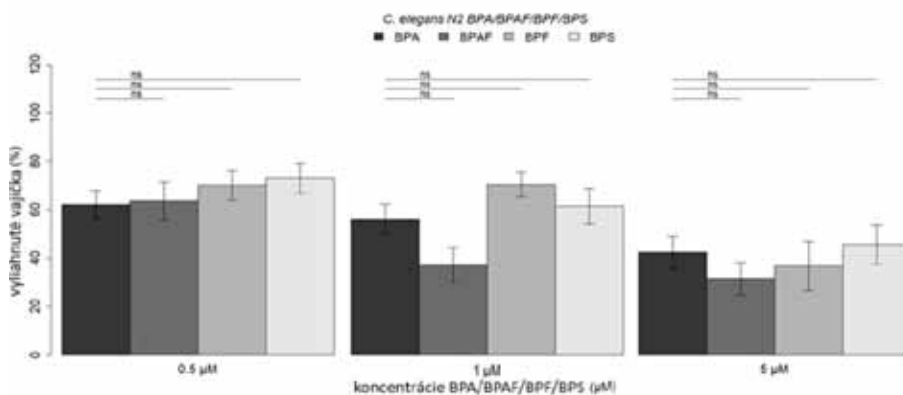
Zmeny v liahnivosti *C. elegans* WT boli monitorované 18 hodín po vystavení vajíčok rôznym koncentráciám bisfenolov (0,5, 1 a 5 μM). Najvyšší počet vyliahnutých hlístovcov bol pozorovaný v kontrolnej skupine.

So zvyšujúcou sa koncentráciou BPA, BPS, BPF a BPAF bolo pozorované nižšie percento vyliahnutých vajíčok *C. elegans*. V našich experimentoch sa signifikantné zníženie liahnutia pozorovalo už pri najnižších koncentráciách (0,5 M) testovaných bisfenolov (BPA, BPS, BPF a BPAF) so signifikantnými výsledkami v rozsahu od $p \leq 0,05$ do $\leq 0,001 \mu\text{M}$) (Graf 1).

Okrem toho, liahnivosť embryí sa pri porovnaní BPA so všetkými jeho analógmi (BPS, BPF, BPAF) významne nelíšila, a to pri žiadnej z testovaných koncentrácií (Graf 2) (Kaiglová *et al.*, 2025).



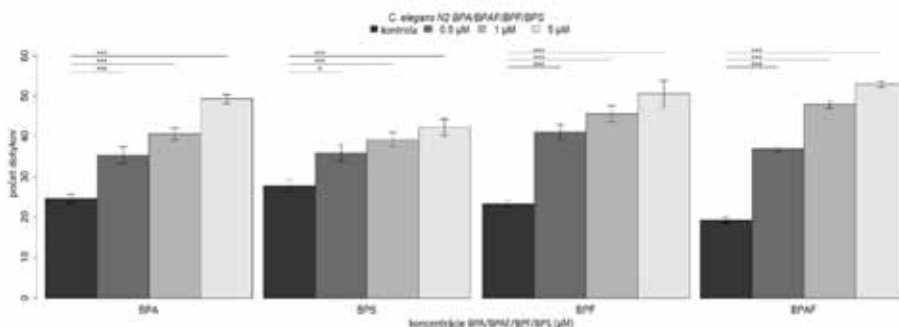
Graf 1: Porovnanie percenta vyliahnutých jedincov *C. elegans* (kmeň N2) po vystavení rôznym koncentráciám bisfenolu A (BPA) a jeho analógov (BPAF, BPF, BPS) vo vzťahu k neexponovanej kontrole. Výsledky ukázali, že so stúpajúcou koncentráciou (0,5, 1 a 5 μM) testovaných bisfenolov) dochádza k štatisticky významnému poklesu liahnutia vajíčok. Na grafickú vizualizáciu bol použitý stĺpcový graf zobrazujúci medián sledovaného parametra, pričom chybové úsečky predstavujú štandardnú chybu mediánu (SEM). Hviezdičky označujú štatisticky významné rozdiely medzi skupinami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Štatistická významnosť rozdielov v porovnaní s kontrolnou skupinou je vyznačená nad príslušnými stĺpcami.



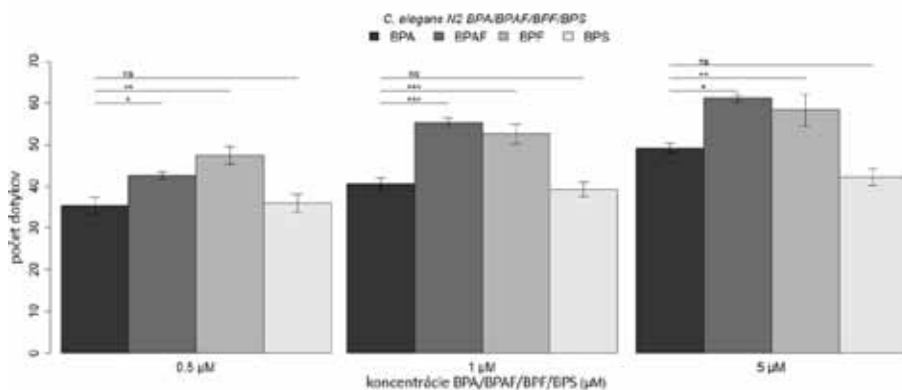
Graf 2: Medzi embryami vystavenými BPA a embryami vystavenými jeho analógom (BPS, BPF, BPAF) sa pri žiadnej z testovaných koncentrácií nepreukázal štatisticky významný rozdiel v liahnivosti.

4.2 Vplyv BPA a jeho náhrad (BPS, BPF, BPAF) na návykové správanie nematód

Podobne ako BPA, aj jeho analógy (v koncentráciách 0,5, 1 a 5 μM) viedli k významnému zvýšeniu počtu podnetov potrebných na habituáciu v porovnaní s kontrolnými hlístovcami vystavenými iba „S-Basal“ (s významnými výsledkami v rozmedzí od $p < 0,05$ do $p < 0,001$) (Graf 3). Porovnanie BPA a jeho náhrad odhalilo významný nárast počtu predných dotykov potrebných na habituáciu pri koncentráciách 0,5 μM a 1 μM pre BPF aj BPAF, čo naznačuje, že tieto náhrady BPA môžu mať ešte škodlivejší vplyv na návykové správanie nematód ako BPA (Graf 4).



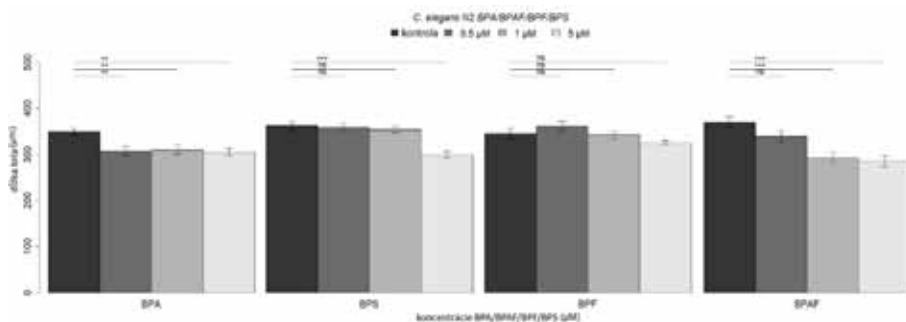
Graf 3: Porovnanie počtu potrebných predných dotykových stimulov počas habituáčného testu u *C. elegans* (kmeň N2) po expozícii BPA, BPS, BPF, BPAF v porovnaní s neexponovanou kontrolou. Rovnako ako pri BPA sa ukázalo, že aj vystavenie *C. elegans* analógom BPA (v koncentráciách 0,5, 1 a 5 μM) viedlo k výraznému zvýšeniu počtu stimulov potrebných na dosiahnutie habituácie v porovnaní s kontrolnou skupinou (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Graf 4: Porovnanie počtu predných dotkových stimulov potrebných na habituáciu u *C. elegans* (kmeň N2) po expozícii BPA a jeho náhradám (BPAF, BPF, BPS). Po embryonálnom vystavení BPF a BPAF (v koncentráciách 0,5, 1 a 5 µM) sa počet dotkových podnetov potrebných na dosiahnutie habituácie výrazne zvýšil v porovnaní s embryonálnou expozíciou rovnakým koncentráciám BPA (* $p < 0,05$ až *** $p < 0,001$).

4.3 Vplyv BPA a jeho náhrad (BPS, BPF, BPAF) na rast nematód

Po 18 hodinách od vystavenia vajíčok jednotlivým druhom bisfenolov (BPA, BPAF, BPF a BPS) sme zaznamenali aj zmeny v dĺžke tela nematód kmeňa WT. Synchronizovaná populácia týchto jedincov sa v tomto čase nachádzala v larválnom štádiu L1. Za bežných fyziologických podmienok dosahujú nematódy v štádiu L1 dĺžku približne 360 – 380 µm v závislosti od inkubačnej teploty. V našich experimentoch bola teplota stabilne udržiavaná na 20 °C. Priemerná dĺžka tela kontrolných nematód bola 371,5 µm, čo zodpovedá typickým hodnotám pre L1 pri tejto teplote. Vplyv bisfenolov na rast *C. elegans* sme hodnotili porovnaním dĺžky tela neexponovanej kontrolnej skupiny s dĺžkami jedincov vystavených rôznym koncentráciám (0,5, 1 a 5 µM) BPA a jeho náhrad (BPAF, BPF a BPS). Naše výsledky ukázali, že larvy *C. elegans* v štádiu L1 mali po expozícii narastajúcim koncentráciám BPA (0,5, 1 a 5 µM) štatisticky významne zníženú dĺžku tela v porovnaní s kontrolou ($p < 0,01$). Expozícia embryí koncentrácii 5 µM BPS taktiež spôsobila štatisticky významné zníženie dĺžky tela ($p < 0,001$), zatiaľ čo koncentrácie 0,5 a 1 µM BPS neviedli k významným zmenám. Výrazné skrátenie tela bolo pozorované aj u nematód vystavených koncentráciám 1 a 5 µM BPAF ($p < 0,001$). Naopak, BPF v žiadnej z testovaných koncentrácií nevykazoval štatisticky významný vplyv na dĺžku tela (Graf 5).



Graf 5: Dĺžka tela *C. elegans* v štádiu L1 bola meraná po expozícii rôznym koncentráciám bisfenolov (BPA, BPAF, BPF, BPS) a porovnaná s neexponovanou kontrolou. BPA vykazoval koncentračne závislé zníženie dĺžky tela, pričom pri najvyššej koncentrácii bola pozorovaná najvýraznejšia redukcia ($p < 0,001$). V prípade BPS bolo štatisticky významné zníženie dĺžky tela embryí zistené len pri najvyššej testovanej koncentrácii $5\mu\text{M}$ ($p < 0,001$). Expozícia BPAF viedla k významnému skráteniu dĺžky tela už pri koncentráciách $1\mu\text{M}$ ($p < 0,01$) a 5mM ($p < 0,001$). Naopak, BPF nepreukázal žiadny štatisticky významný vplyv na dĺžku tela hlístovcov pri žiadnej z testovaných koncentrácií.

4.4 Sledovanie účinku BPA a jeho náhrady BPS na *C. elegans* kmeň Bristol (N2) a mutantný kmeň *bli-1*

V práci Kucharíková *et al.* (2023) sme naše pozorovania doplnili o sledovanie účinku BPA a jeho náhrady BPS na mutantný kmeň *C. elegans* s utlmenou expresiou génu *bli-1*, ktorý kóduje kolagén BLI-1 zodpovedný za správnu tvorbu podporných štruktúr v mediálnej časti kutikuly.

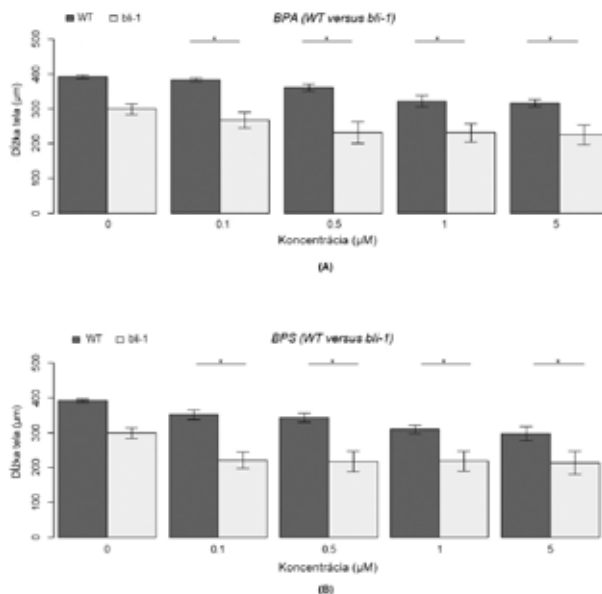
Oba testované bisfenoly (BPA aj jeho substitút BPS) spôsobili významné zmeny v dĺžke tela mutantného kmeňa (*bli-1*) v porovnaní s kmeňom WT ($p < 0,05$) (Graf 6).

Podobne, zvýšené dávky BPA (0,5, 1 a $5\mu\text{M}$) a BPS (1 a $5\mu\text{M}$) signifikantne znížili počet vyliahnutých vajíčok mutantného kmeňa *C. elegans bli-1* v porovnaní s bežne používaným kmeňom WT ($p \leq 0,05$) (Graf 7).

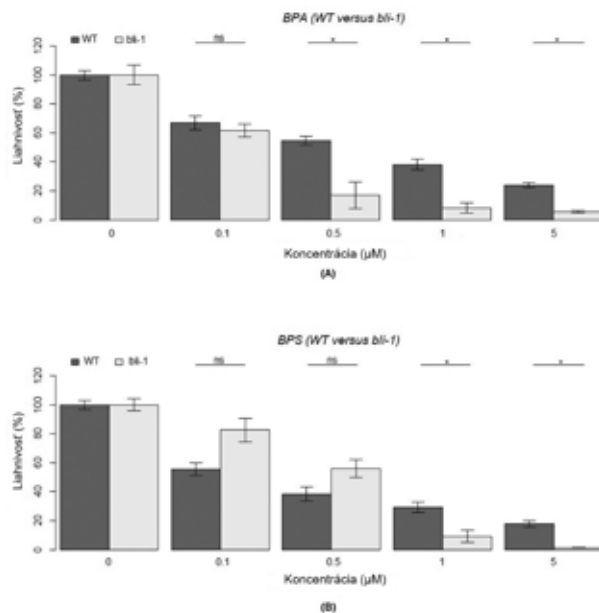
Vystavenie embryí všetkým testovaným koncentráciám BPA (0,1, 0,5, 1 a $5\mu\text{M}$) viedlo k výrazne zvýšenému počtu dotykov u mutantnej formy *C. elegans bli-1* v porovnaní s WT ($p \leq 0,05$) (Graf 8).

Navyše, s rastúcimi koncentraciami BPA (0,1, 0,5, 1 a $5\mu\text{M}$) a BPS (0,5, 1 a $5\mu\text{M}$) potrebovali kmene *C. elegans* N2 (WT) aj *bli-1* na navodenie habituácie výrazne viac podnetov v porovnaní s kontrolnými jedincami ($p \leq 0,05$) (Graf 9).

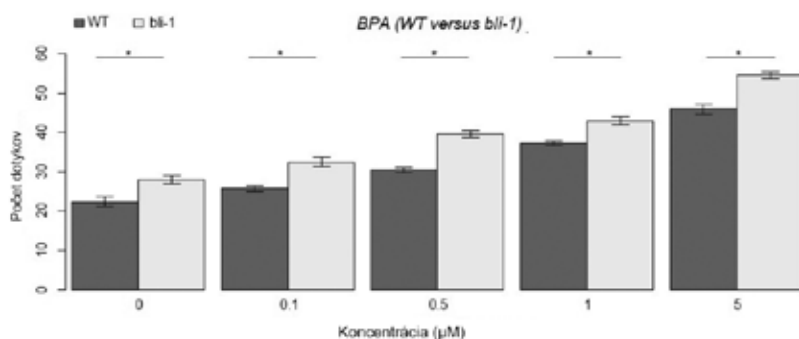
4. Výsledky



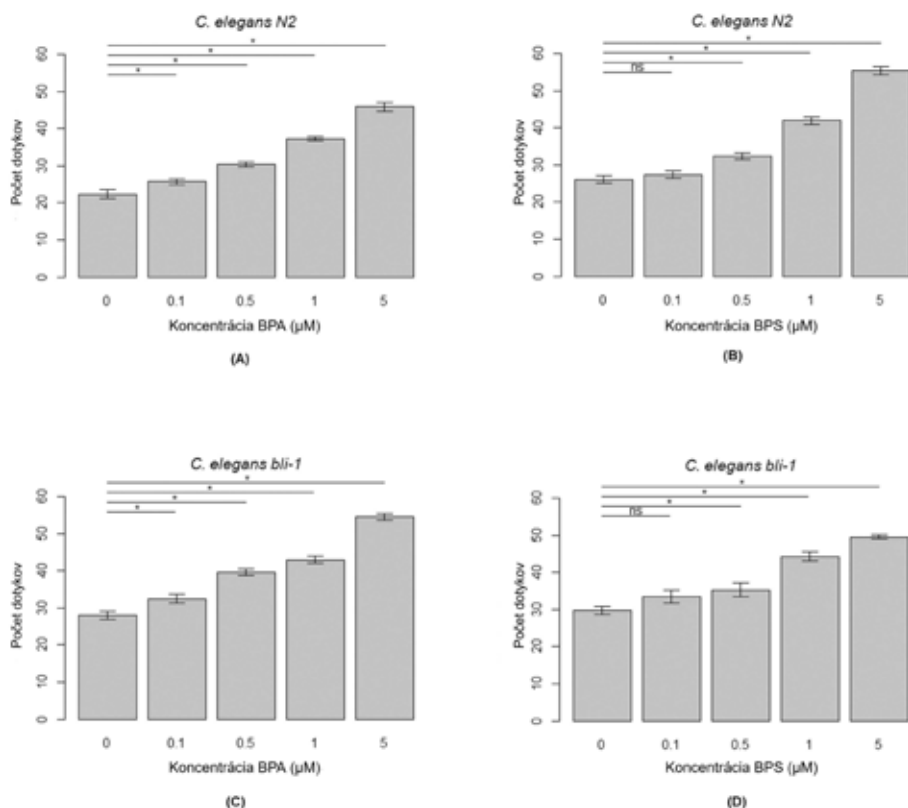
Graf 6: Mutantný kmeň *C. elegans* bli-1 bol ovplyvnený embryonálnou expozíciou BPA a BPS signifikantne výraznejšie v porovnaní s kmeňom N2 („wild type“) ($p < 0,05$).



Graf 7: Vyššie koncentrácie BPA (0,5, 1 a 5 µM) a BPS (1 a 5 µM) výrazne zredukovali percento vyľiahnutých vajíčok mutovaného kmeňa *C. elegans* bli-1 v porovnaní s bežne používaným kmeňom N2 „wild type“ (WT) ($p \leq 0,05$).



Graf 8: Expozícia embryí každej z testovaných koncentrácií BPA (0,1, 0,5, 1 a 5 µM) spôsobila výrazné zvýšenie počtu dotykových reakcií u mutantného kmeňa *C. elegans bli-1* v porovnaní s WT ($p \leq 0,05$).



Graf 9: Reakcia *C. elegans* (N2) a mutantného kmeňa *bli-1* na dotyk prednej časti tela po expozícii bisfenolu A (BPA) a bisfenolu S (BPS). Embryá *C. elegans* N2 a *bli-1* boli vystavené rôznym dávkam BPA (0,1, 0,5, 1 a 5 µM) a BPS (0,1, 0,5, 1 a 5 µM), s rastúcimi koncentraciami bisfenolov sa zvyšoval počet dotýkov v hlavovej časti tela potrebných na habituáciu.

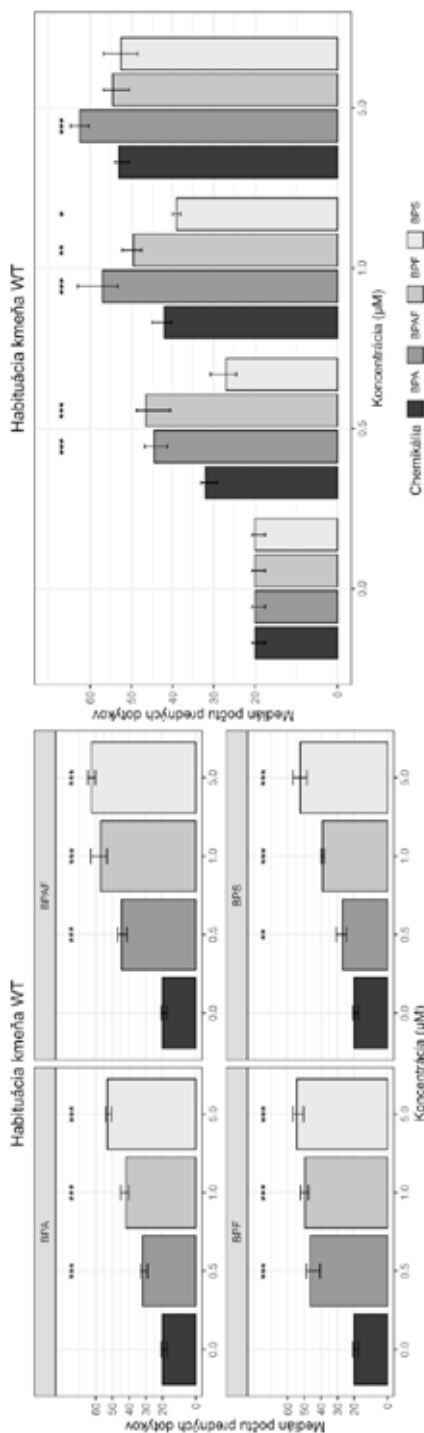
4.5 Hodnotenie účinkov bisfenolov (BPA, BPS, BPF, BPAF) na *C. elegans* kmeňa WT v porovnaní s mutantnými kmeňmi *rol-1*, *rol-6*, *sqt-1*

4.5.1 Vplyv (BPA, BPS, BPF, BPAF) na návykové správanie *C. elegans* kmeňa WT v porovnaní s mutantnými kmeňmi *rol-1*, *rol-6*, *sqt-1*

Pri výskume vplyvu bisfenolov (BPA, BPS, BPF a BPAF) na nervový systém *C. elegans* sme sa zamerali na sledovanie habituácie (návykového správania) kmeňa WT a mutantných kmeňov (*rol-1*, *rol-6*, *sqt-1*). Habituácia bola hodnotená prostredníctvom počtu dotykov tela („body touches“) po opakovanej stimulácii.

U všetkých testovaných kmeňov *C. elegans* (WT a mutantné kmene) sa pre každý typ bisfenolu zistil koncentračne závislý nárast počtu dotykov. Tento nárast indikuje spomalenie alebo narušenie procesu habituácie, čo je kľúčový prejav neurotoxicity. Expozícia červov všetkým koncentráciám bisfenolov (0,5 mM, 1 mM a 5 mM) vo väčšine prípadov viedla k štatisticky vysoko signifikantnému zvýšeniu potrebných dotykov pre habituáciu ($p < 0,01$ až $p < 0,001$) u všetkých kmeňov oproti kontrolnej skupine (Príloha 1, Graf 1A, 2A, 3A, 4A). Pri porovnaní náhrad BPA (konkrétne BPS, BPF a BPAF) so samotným BPA sa ukázalo, že náhrady (najmä BPAF a BPF, ale v niektorých prípadoch aj BPS) majú rovnaký alebo dokonca silnejší účinok ako BPA na spomalenie procesu habituácie (t. j., potrebovali väčší počet dotykov, aby si zvykli na podnety) u hlístovcov *C. elegans*, čo bolo obzvlášť výrazné pri kmeňoch *rol-1* a *sqt-1* ($p < 0,01$ až $p < 0,001$). Tieto zistenia spoločne potvrdzujú, že neurotoxické pôsobenie bisfenolov závisí od koncentrácie a čiastočne aj od ich chemickej štruktúry, pričom náhrady BPA nepredstavujú z pohľadu habituáčného správania bezpečnejšiu alternatívu (Príloha 1, Graf 1B, 2B, 3B, 4B).

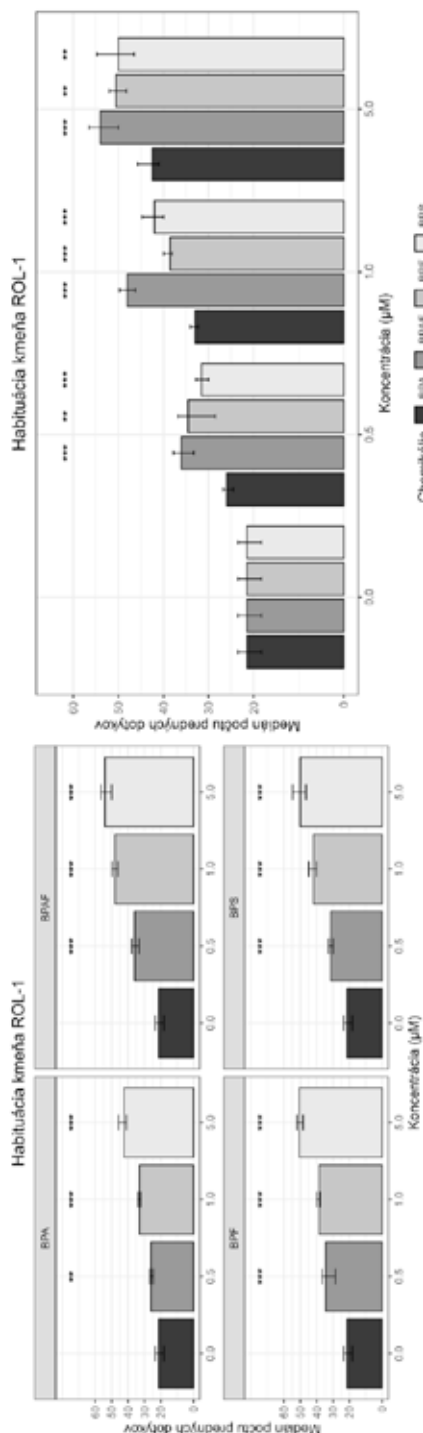
Príloha 1 / Graf 1 (časť A a B)



A. Počet predných dotýkových podnetov kmeňa WT pre jednotlivé bisfenoly

B. Počet predných dotýkových podnetov kmeňa WT v porovnaní s referenčnou chemikáliou (BPA)

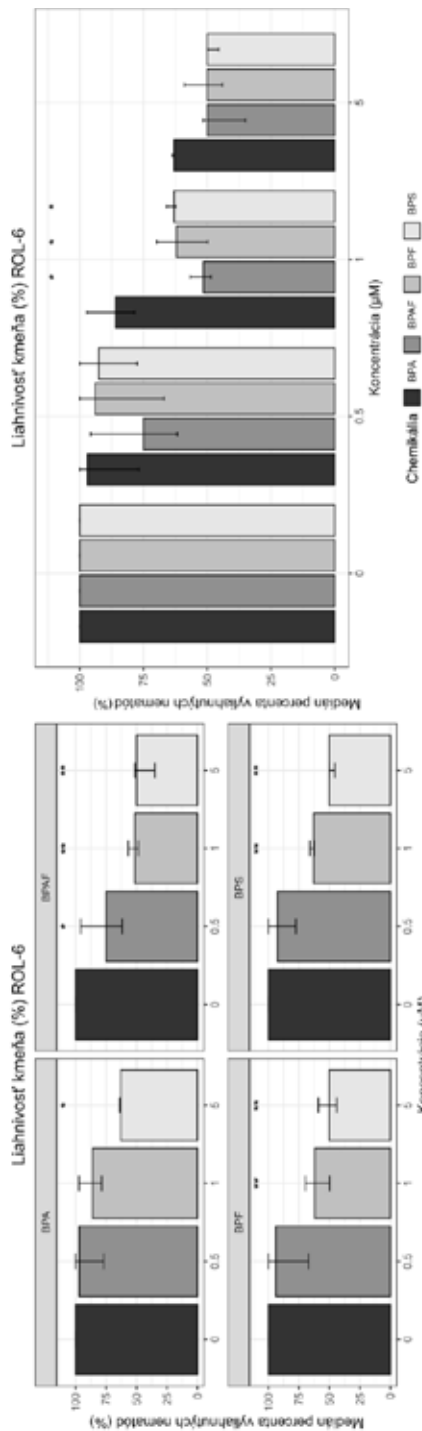
Príloha 1 / Graf 2 (časť A a B)



A. Počet predných dotýkových podnetov kmeňa *rol-1* pre jednotlivé bisfenoly

B. Počet predných dotýkových podnetov kmeňa *rol-1* v porovnaní s referenčnou chemikáliou (BPA)

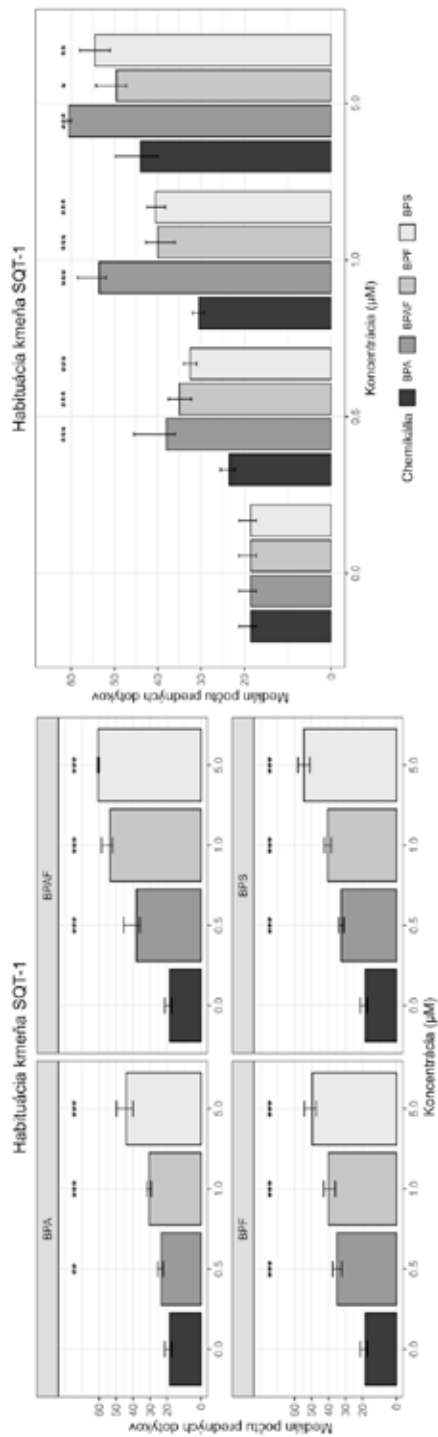
Príloha 1 / Graf 3 (časť A a B)



A. Percento liahnivosti nematód kmeňa *rol-6* pre jednotlivé bisfenoly

B. Percento liahnivosti nematód kmeňa *rol-6* v porovnaní s referenčnou chemikáliou (BPA)

Príloha 1 / Graf 4 (časť A a B)



A. Počet predných dotykových podnetov kmeňa *sqt-1* pre jednotlivé bisfenoly

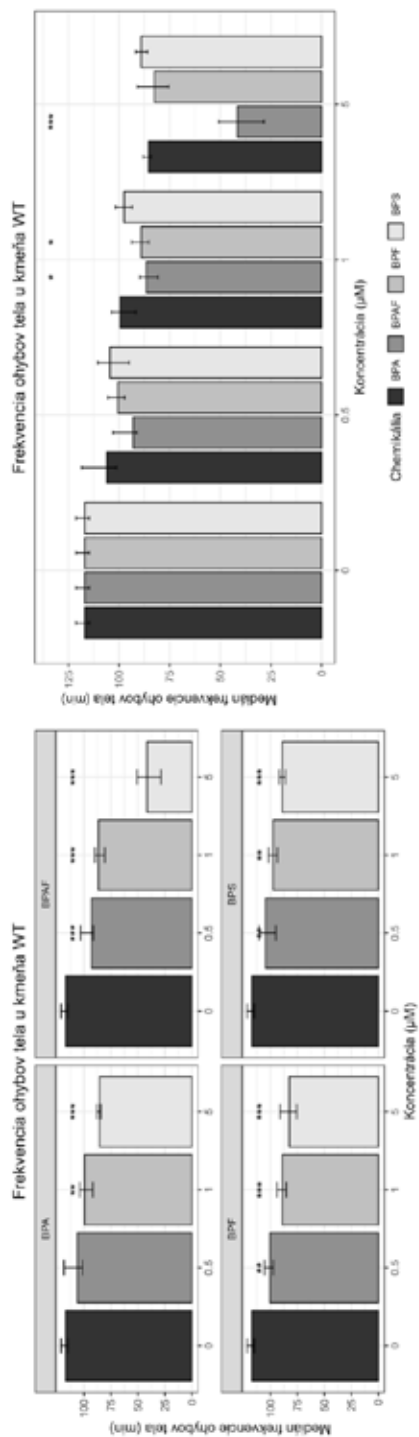
B. Počet predných dotykových podnetov kmeňa *sqt-1* v porovnaní s referenčnou chemikáliou (BPA)

4.5.2 Vplyv bisfenolov (BPA, BPS, BPF, BPAF) na frekvenciu ohybov tela *C. elegans* kmeňa WT v porovnaní s mutantnými kmeňmi *rol-1*, *rol-6*, *sqt-1*

U kmeňa *C. elegans* WT so stúpajúcou koncentráciou bisfenolov dochádzalo k výraznejšiemu narušeniu pohybu, pričom štatisticky významný pokles nastal typicky už pri koncentráciách 1 až 5 mM pre všetky testované látky. Pri najvyššej koncentrácii 5 mM sa ako najsilnejší inhibitor motility ukázal BPAF, ktorý viedol k najnižšej zaznamenatej frekvencii ohybov ($p < 0,001$). Ostatné bisfenoly (BPA, BPF, BPS) mali pri rovnakej koncentrácii podobný, ale mierne slabší účinok ($p < 0,01$ až $p < 0,001$) (Príloha 2, Graf 1A). Pri porovnaní účinku substitútov BPA (BPS, BPF, BPAF) s referenčnou chemikáliou BPA sa pri koncentrácii 1 μ M pozorovali zreteľné rozdiely v prípade BPF a BPAF (v oboch prípadoch $p < 0,05$) a v pri koncentrácii 5 μ M v prípade BPAF ($p < 0,001$) (Príloha 2, Graf 1B). Celkovo výsledky potvrdzujú, že bisfenoly znižujú motilitu kmeňa WT, čo sa prejavuje znížením frekvencie ohybov tela. Substitút BPA – BPAF vykazoval najsilnejší potenciál voči tomuto pohybovému fenotypu.

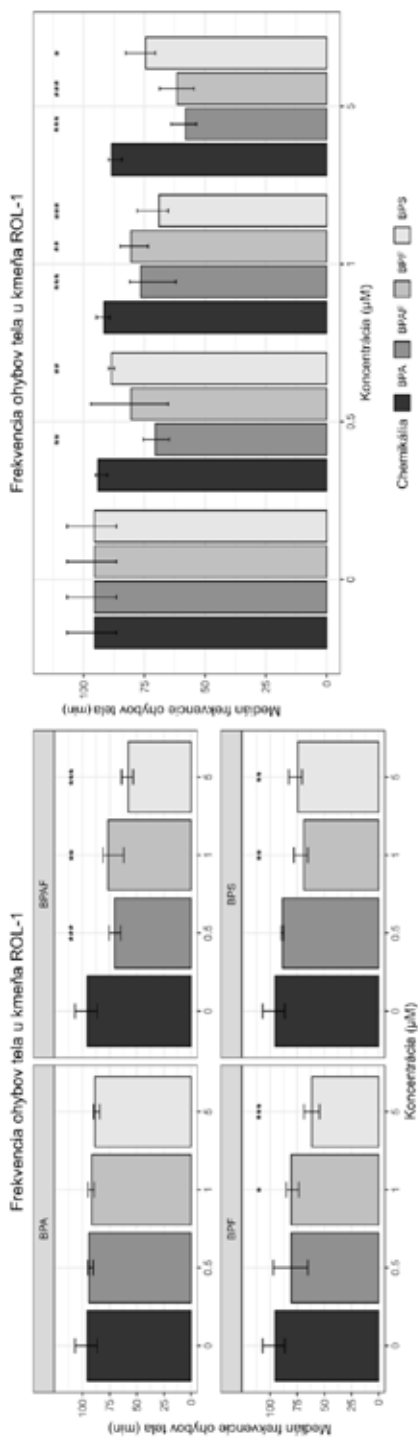
Podobný, no diferencovaný vplyv bol pozorovaný aj pri mutantných kmeňoch *rol-1* a *rol-6*. Expozícia týmto bisfenolom viedla k zníženiu frekvencie ohybov tela, ktoré záviselo od koncentrácie aj od typu chemikálie. Zatiaľ čo BPA nespôsobil pri kmeni *rol-1* pokles motorickej aktivity, substitúty bisfenolov (BPAF, BPF, BPS) vykazovali výraznejšie a konzistentnejšie zníženie frekvencie už od koncentrácií 0,5 – 1 mM ($p < 0,05$ až $p < 0,001$). Pri kmeni *rol-6* sme zaznamenali pri všetkých typoch bisfenolov pri použitých koncentráciách signifikantné zníženie frekvencie ohybov tela oproti kontrole ($p < 0,05$ až $p < 0,001$) (Príloha 2, Graf 2A a 3A). Podobne frekvencia ohybov tela za minútu u substitútov BPA (BPAF, BPF a BPS) v porovnaní s BPA pri týchto kmeňoch viedla k signifikantným zmenám ($p < 0,01$ až $p < 0,001$) (Príloha 2, Graf 2B a 3B).

Napokon, aj v prípade kmeňa *C. elegans sqt-1* viedla expozičia BPA, BPAF, BPF a BPS k štatisticky významnému zníženiu frekvencie pohybu tela pri koncentráciách 1 mM a 5 mM v porovnaní s kontrolou. Dokonca pri BPA, BPAF a BPF boli významné účinky pozorované už pri koncentrácii 0,5 mM ($p < 0,01$ až $p < 0,001$) (Príloha 2, Graf 4A). Porovnanie substitútov BPA (BPAF, BPF a BPS) s BPA neodhalilo ani pri tomto kmeni žiadne signifikantné zmeny vo frekvencii ohybov tela za minútu (Príloha 2, Graf 4B). Tieto zistenia naznačujú, že náhrady BPA neponúkajú z hľadiska akútnej neurotoxicity voči *C. elegans sqt-1* žiadnu významnú výhodu oproti pôvodnému BPA.



A. Frekvencia ohybov tela nematód kmeňa WT pre jednotlivé bisfenoly

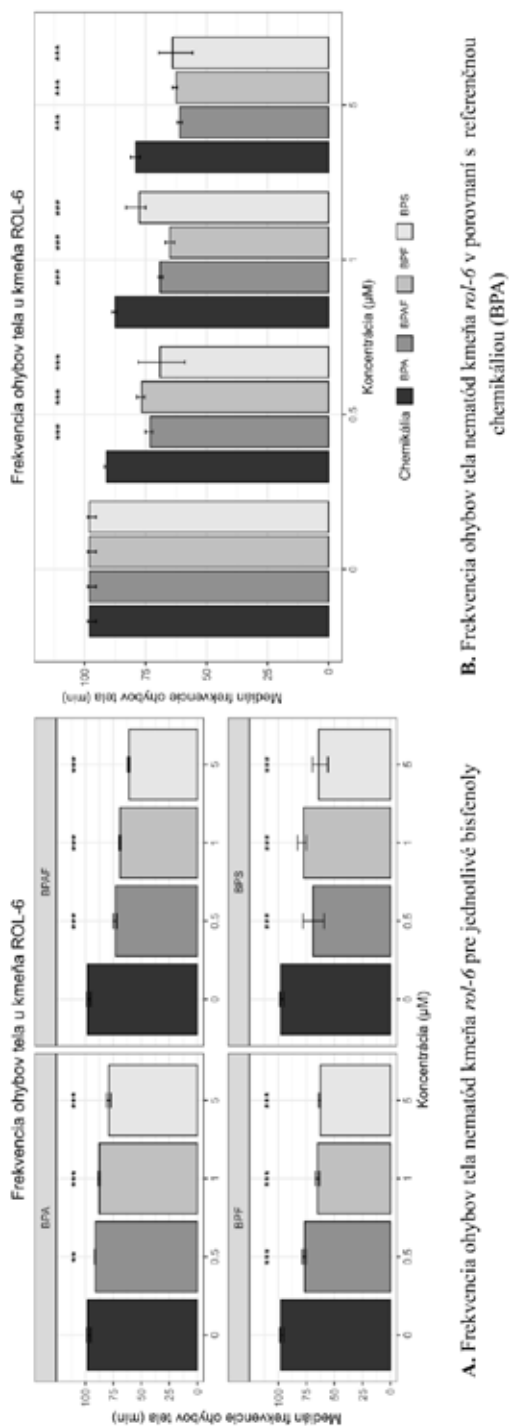
B. Frekvencia ohybov tela nematód kmeňa WT v porovnaní s referenčnou chemikáliou (BPA)



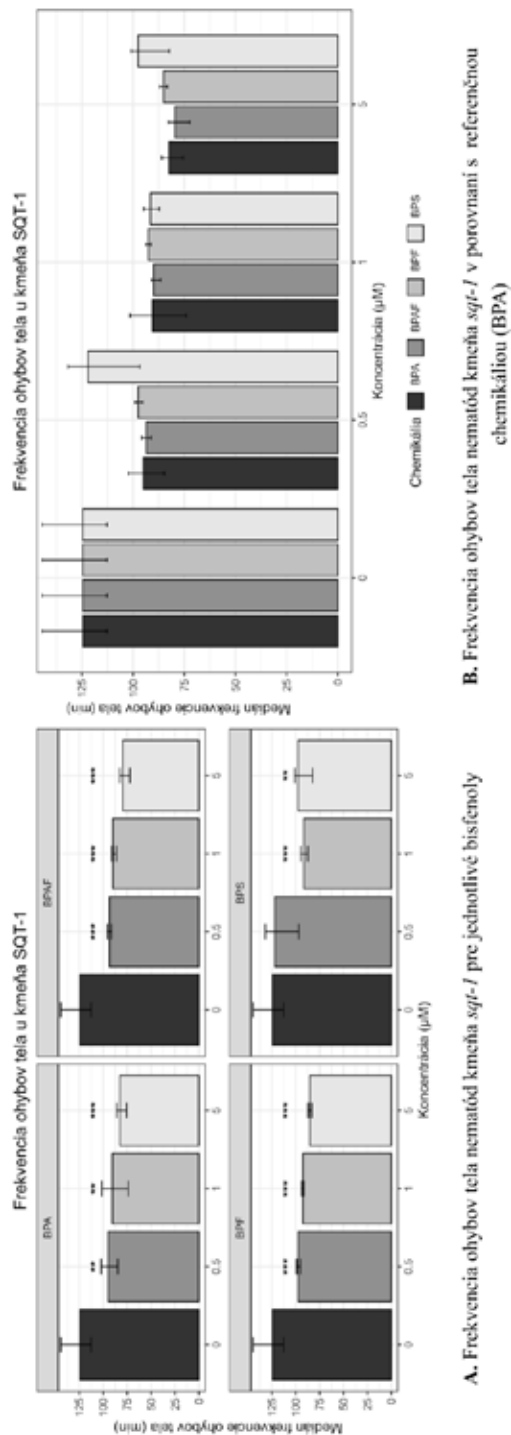
A. Frekvencia ohybov tela nematód kmeňa *rol-1* pre jednotlivé bisfenoly

B. Frekvencia ohybov tela nematód kmeňa *rol-1* v porovnaní s referenčnou chemikáliou (BPA)

Príloha 2 / Graf 3 (časť A a B)



Príloha 2 / Graf 4 (časť A a B)



4.5.3. Vplyv bisfenolov (BPA, BPS, BPF, BPAF) na liahnivosť *C. elegans* kmeňa WT v porovnaní s mutantnými kmeňmi *rol-1*, *rol-6*, *sqt-1*

Expozícia kmeňa WT všetkým typom bisfenolov (BPA, BPS, BPAF, BPF) viedla k signifikantnému poklesu liahnivosti pri koncentráciách 0,5, 1 a 5 μM ($p < 0,05$ až $p < 0,01$) (Príloha 3, Graf 1A). Pri koncentracii 0,5 μM neboli pri BPF ani BPAF pozorované významné rozdiely v liahnivosti oproti BPA, zatiaľ čo BPS ju signifikantne zvýšil ($p < 0,05$). Pri 1 μM bolo výrazné zníženie zaznamenané len pri BPAF ($p < 0,05$). Pri 5 μM sa inhibičný účinok BPF a BPAF zachoval, avšak bez štatistickej významnosti. BPS, naopak, vykazoval zvýšenú liahnivosť pri všetkých testovaných koncentráciách, hoci pri 1 a 5 μM boli zmeny nesignifikantné (Príloha 3, Graf 1B).

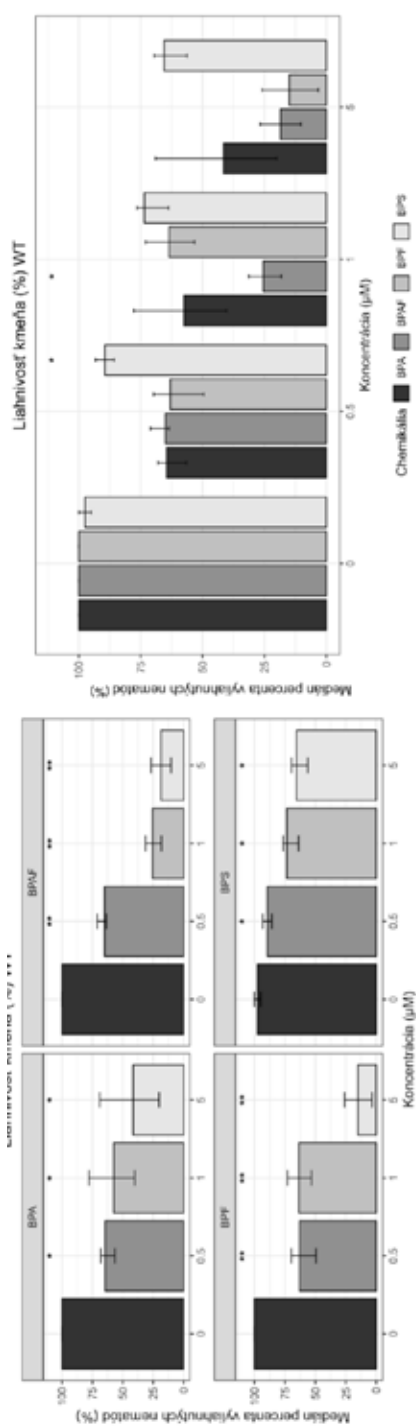
Po expozícii bisfenolom sa u kmeňa *rol-1* preukázalo signifikantné zníženie liahnivosti pri BPA a BPS pri koncentráciách 1 a 5 μM (vo všetkých prípadoch $p < 0,05$). Pri BPAF bolo zníženie liahnivosti významné pri všetkých testovaných koncentráciách (vo všetkých prípadoch $p < 0,05$). Pri expozícii BPF sa významné zníženie liahnivosti prejavilo až pri koncentrácii 5 μM ($p < 0,05$) (Príloha 3, Graf 2A). Pri porovnaní BPA s jeho substitútmi nebol zaznamenaný signifikantný rozdiel (Príloha 3, Graf 2B).

Percento vyliahnutých nematód kmeňa *rol-6* po expozícii bisfenolom bolo znížené pri všetkých testovaných látkach v závislosti od koncentrácie. Pri BPA bolo zníženie významné pri koncentrácii 5 μM ($p < 0,01$). Podobne sa významné zníženie pozorovalo pri BPF a BPS pri koncentráciách 1 μM a 5 μM (v oboch prípadoch $p < 0,01$) a pri BPAF pri všetkých sledovaných koncentráciách ($p < 0,05$ až $p < 0,01$) (Príloha 3, Graf 3A). Pri porovnávaní BPA s jeho substitútmi bol zaznamenaný signifikantný rozdiel pri koncentrácii 1 μM pre všetky typy náhrad BPA (BPS, BPF, BPAF) (vo všetkých prípadoch $p < 0,05$) (Príloha 3, Graf 3B).

U kmeňa *sqt-1* nespôsobila expozícia BPA žiadne významné zmeny liahnivosti v celom rozsahu koncentrácií. BPAF spôsobil signifikantné zníženie liahnivosti pri všetkých testovaných koncentráciách (0,5, 1 a 5 μM ; $p < 0,05$), pričom z grafických výsledkov je zrejmý trend postupného poklesu so zvyšujúcou sa koncentráciou. BPF znížil liahnivosť pri 1 μM a 5 μM (v oboch prípadoch $p < 0,05$) a BPS pri 5 μM ($p < 0,05$) (Príloha 3, Graf 4A).

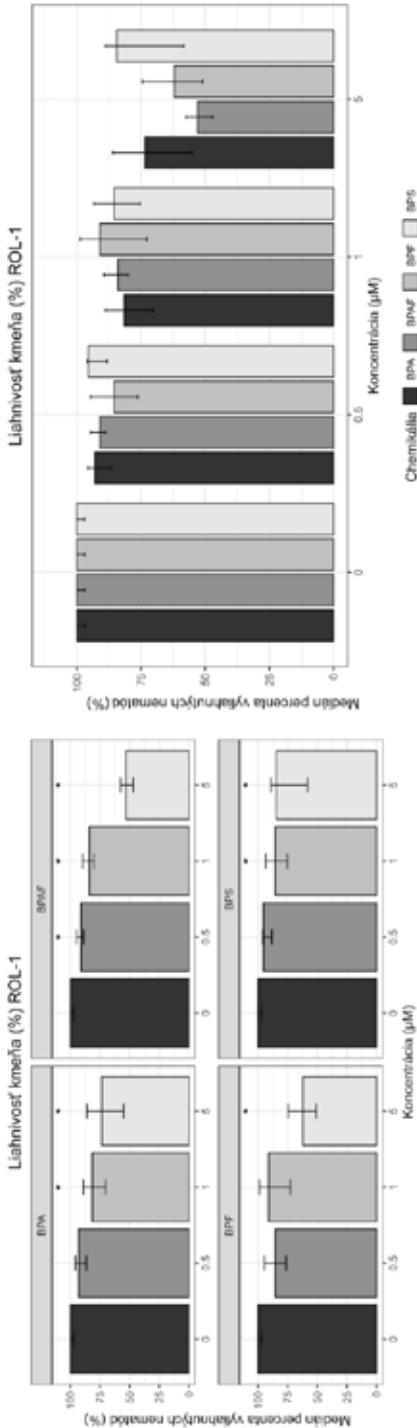
Pri porovnaní účinku substitútov BPA (BPS, BPF, BPAF) s BPA sa pri nízkych koncentráciách (0 – 0,5 μM) nepozorovali zreteľné rozdiely. Pri 1 μM spôsobil BPAF signifikantné zníženie liahnivosti v porovnaní s BPA ($p < 0,05$) (Príloha 3, Graf 4B).

Príloha 3 / Graf 1 (časť A a B)



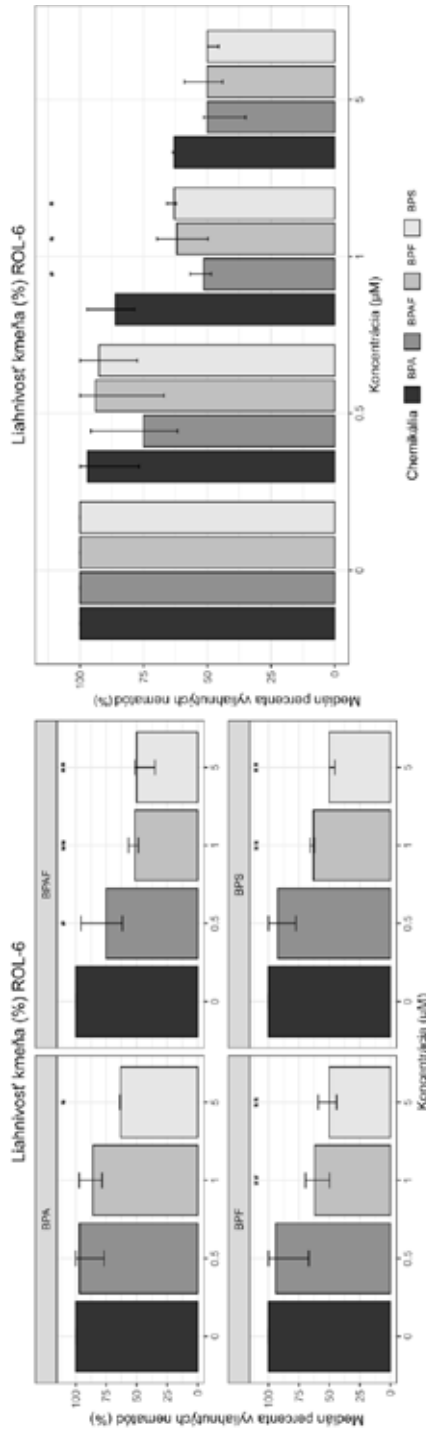
B. Percento liahnivosti nematód kmeňa WT v porovnaní s referenčnou chemikáliou (BPA)

Príloha 3 / Graf 2 (časť A a B)



B. Percento liahnivosti nematód kmeňa *rol-1* v porovnaní s referenčnou chemikáliou (BPA)

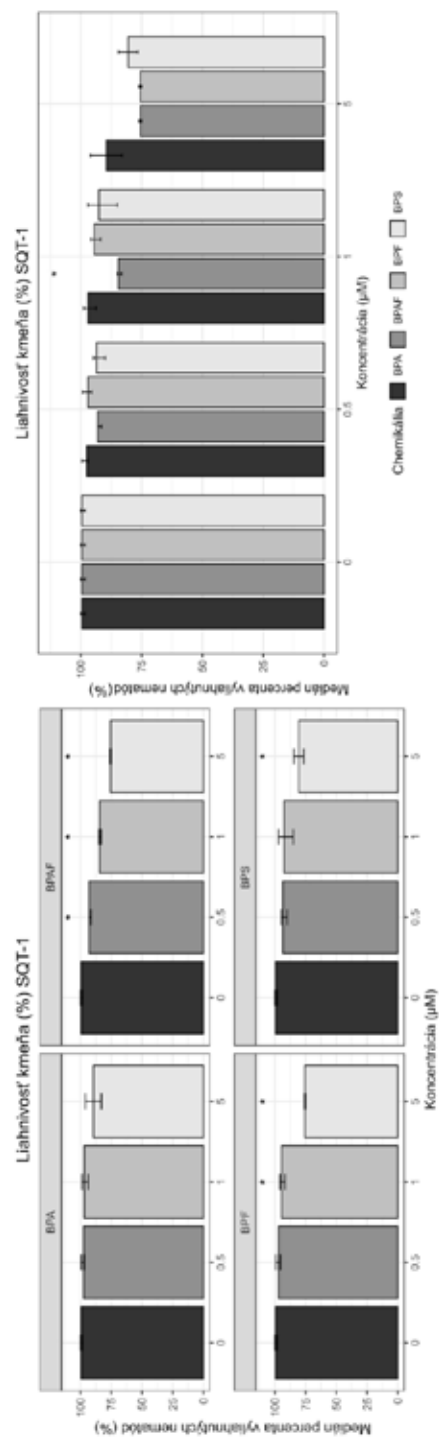
Príloha 3 / Graf 3 (časť A a B)



A. Percento ľahnosti nematód kmeňa *rol-6* pre jednotlivé bisfenoly

B. Percento ľahnosti nematód kmeňa *rol-6* v porovnaní s referenčnou chemikáliou (BPA)

Príloha 3 / Graf 4 (časť A a B)



A. Percento ľahnosti nematód kmeňa *sqt-1* pre jednotlivé bisfenoly

B. Percento ľahnosti nematód kmeňa *sqt-1* v porovnaní s referenčnou chemikáliou (BPA)

5. DISKUSIA

Masová výroba a používanie plastov je dnes bežnou súčasťou modernej spoločnosti a má významný vplyv na životné prostredie aj ľudské zdravie. Keďže plastové materiály nie sú chemicky inertné, dochádza z nich k postupnému uvoľňovaniu širokého spektra biologicky aktívnych zlúčenín do okolitého prostredia a následne do ľudského organizmu. Medzi najkritickejšie látky patria endokrinné disruptory, najmä skupina bisfenolov, ktorých prítomnosť bola opakovane potvrdená nielen v environmentálnych zložkách, ale aj v biologických vzorkách (Biedermann *et al.*, 2010, Geens *et al.*, 2010, Mielke *et al.*, 2011, Wilson *et al.*, 2007). V kontexte environmentálnej toxikológie predstavuje expozícia bisfenolom komplexný problém, pričom k vstupu týchto látok do organizmu dochádza tromi hlavnými cestami. Dominantný podiel na celkovej expozícii má dietárna cesta, realizovaná prestupom BPA z obalových materiálov (polykarbonátové plasty, epoxidové živice konzerv) do potravín a tekutín. Tento spôsob je kritický v raných štádiách vývinu, keďže významným zdrojom môže byť materské i kravské mlieko (Geens *et al.*, 2010, Mercogliano a Santonicola, 2018). Ďalšou cestou vstupu je dermálna absorpcia, viazaná predovšetkým na priamy kontakt s termopapierom (účtenky), čo indikuje zvýšené profesijné riziko najmä u pracovníkov v obchode (Zalko *et al.*, 2011). Významná je tiež inhalačná expozícia prostredníctvom prachových častíc a výparov v kontaminovanom ovzduší (Vasiljevic a Harner, 2021). Kumulatívna miera záťaže organizmu je teda determinovaná kombináciou individuálneho životného štýlu, stravovacích návykov a environmentálnych faktorov vrátane blízkosti priemyselných zón (Abraham a Chakraborty, 2020). Pre objektívne posúdenie zdravotných rizík je preto nevyhnutné zohľadňovať synergický efekt všetkých uvedených expozičných ciest (Abraham a Chakraborty, 2020).

V roku 2023 pristúpil úrad EFSA k revízii limitov pre BPA a stanovil novú hodnotu TDI na 0,2 ng/kg telesnej hmotnosti/deň pri celoživotnej chronickej expozícii (EFSA, 2023). V porovnaní s predchádzajúcim limitom z roku 2015, ktorý bol určený na úrovni 4 µg/kg telesnej hmotnosti/deň, predstavuje táto úprava 20 000-násobné sprísnenie bezpečnostnej normy (EFSA, 2015). Napriek tomuto opatreniu zostáva spoľahlivosť TDI predmetom odborných diskusií. Problematickou je najmä nemonotónna krivka závislosti účinku od dávky („*dose-response curve*“), ktorú BPA vykazuje. Uvedená skutočnosť naznačuje, že zdravotné riziká pre populáciu môžu predstavovať aj mimoriadne nízke expozičné dávky (Badding *et al.*, 2019). Tento fenomén úzko súvisí

s jeho schopnosťou pôsobiť ako agonista alebo antagonista špecifických hormonálnych receptorov, čím dochádza k narušeniu endokrinnej homeostázy. Keďže fyziologické ligand-receptorové interakcie natívnych hormónov prebiehajú prirodzene pri pikomolárnych až nanomolárnych koncentráciách, aj nízke dávky exogénneho BPA môžu efektívne saturovať tieto receptory a vyvolať nežiaducu biologickú odpoveď.

Narastajúce obavy z toxicity BPA (predovšetkým v kontexte jeho interferencie s hormonálnou homeostázou) iniciovali priemyselný prechod k alternatívnym materiálom s označením „BPA-free“ a viedli k syntéze a komerčnému využívaniu jeho štrukturálnych analógov, predovšetkým BPAF, BPF a BPS. Tieto substancie sa v súčasnosti etablovali ako primárne náhrady pri výrobe epoxidových živíc, polykarbonátov, termopapierov a v technológiách spevňovania plastov určených pre spotrebný trh (Chen *et al.*, 2016a).

Nedostatočná regulácia alternatív k BPA viedla k ich masívnemu rozšíreniu v spotrebnom tovare, čo vyvoláva opodstatnené obavy, že pôvodný problém bol nahradený analogickým rizikom v podobe tzv. nežiaducich náhrad („*regrettable substitution*“) (Žalmanová *et al.*, 2017, Cano-Nicolau *et al.*, 2016, Moon, 2019). Najnovšie vedecké poznatky túto nepostačujúcu reguláciu potvrdzujú a zdôrazňujú, že kľúčovou podmienkou uvedenia nových substitútov na trh musí byť ich prísne preventívne posudzovanie (Franko *et al.*, 2024, Buso *et al.*, 2025, Srebný *et al.*, 2025).

Hoci bol BPS zavedený ako bezpečnejšia náhrada za BPA, výsledky Žalmanovej *et al.* (2017) tento predpoklad vyvracajú. Na modeli prasacích oocytov bolo zistené, že BPS signifikantne poškodzuje meiotické vretienko a bráni správne dozrievaniu buniek. Prítomnosť nepriaznivých účinkov aj pri stopových množstvách látky v prostredí poukazuje na problematický charakter tejto náhrady (Žalmanová *et al.*, 2017). Výskum *in vivo* na myšom modeli potvrdil, že chronická expozícia BPS narušuje folikulogézu a kvalitu oocytov. Autori zistili, že zatiaľ čo nízke dávky (0,001 a 0,1 ng/g telesnej hmotnosti) primárne redukujú počet ovariálnych folikulov a poškodzujú cytoskelet oocytov, vyššie koncentrácie (10 a 100 ng/g telesnej hmotnosti) vyvolávajú epigenetické zmeny (Nevoral *et al.*, 2018). Tieto negatívne dopady na fertilitu a embryogézu potvrdzujú aj experimenty na modelovom organizme *C. elegans*, kde expozícia embrií BPA a BPS viedla k zníženiu reprodukčnej kapacity a miery liahnutia (Mersha *et al.*, 2015). V súlade s tým boli aj výsledky experimentu Kaiglová *et al.* (2025), ktoré potvrdili negatívny dopad bisfenolov (BPA, BPS, BPF a BPAF) na embryonálny vývin *C. elegans*. U všetkých testovaných zlúčenín bolo zaznamenané štatisticky významné zníženie liahnivosti vajíčok v porovnaní s kontrolnou skupinou, a to už pri ich najnižších koncentráciách ($p < 0,05$ až 0,001) (Graf 1). Keďže medzi účinkami jednotlivých bisfenolov ne-

boli pozorované významné rozdiely, možno konštatovať, že tieto látky predstavujú pre embryá nematód porovnateľné riziko (Graf 2) (Kaiglová *et al.* 2025). Podobné výsledky sme zistili aj štúdií Kucharíková *et al.* (2023), kde BPA, ale aj BPS v koncentrácii 1 a 5 μM signifikantne znížil liahnivosť hlístovcov, a to pri kmeni *C. elegans* „wild type“ (N2), ako aj kmeni *bli-1* s utlmeným rovnomeným génom v porovnaní s kontrolnou skupinou, ktorá nebola exponovaná bisfenolom ($p < 0,05$) (Graf 6). Pri porovnaní oboch kmeňov *C. elegans* bola liahnivosť kmeňa *bli-1* signifikantne nižšia. Gén *bli-1* u modelového organizmu *C. elegans* kóduje špecifický kutikulárny kolagén, ktorý je nevyhnutný pre štrukturálnu integritu a stabilitu vonkajšieho obalu (kutikuly) červa. Tento proteín sa nachádza predovšetkým v strednej vrstve kutikuly, kde funguje ako mechanické spojivo zabezpečujúce pevnú adhéziu medzi jednotlivými vrstvami povrchu tela. Pri mutácii tohto génu dochádza k narušeniu týchto spojení, čo vedie k separácii vrstiev a následnému hromadeniu tekutiny, ktoré sa navonok prejavuje vznikom charakteristických pľuzgierov (fenotyp „blister“). Keďže takto poškodená kutikula stráca svoju prirodzenú bariérovú funkciu, mutantné jedince vykazujú zvýšenú citlivosť na stresory z prostredia, akými sú napríklad vysoké koncentrácie chemických látok typu bisfenolov.

Okrem reprodukčnej toxicity sa bisfenoly spájajú aj s neurologickými a behaviorálnymi abnormalitami. Štúdiá kolektívu Tiwari *et al.* (2015) skúmala vplyv BPA na vývin mozgu potkanov, konkrétne na proces tvorby myelínu (izolačnej vrstvy nervových vlákien) v hipokampe. Štúdiá naznačuje, že BPA neničí mozgové tkanivo len priamo, ale aj prostredníctvom navodenia mitochondriálnej dysfunkcie, oxidačného stresu a narušenia signálnych dráh, ktoré sú nevyhnutné pre zdravý vývin nervovej sústavy. Tieto biologické zmeny viedli u testovaných potkanov k merateľným deficitom v učení a pamäti. Pretože hipokampus je centrom pamäte, jeho poškodenie BPA priamo zhoršilo kognitívne funkcie (Tiwari *et al.*, 2015). Výskum, ktorý v roku 2023 publikoval Mu so spoluautormi na modeli zebričky pruhovanej (*Danio rerio*) potvrdil, že expozícia embryí BPA a jeho náhradám (BPAF a BPF) negatívne ovplyvňuje ich sociálne správanie. Tieto experimentálne modely navyše identifikovali neuroinflamáciu a úzkostné stavy ako priamy dôsledok pôsobenia spomínaných látok počas kľúčových fáz vývinu. Ryby boli od embryonálneho obdobia kontinuálne vystavené environmentálne relevantným dávkam BPA, BPAF a BPF (5 a 500 ng/l) a následne podrobené behaviorálnym testom. Výsledky ukázali, že jedince exponované BPAF a BPA v koncentrácii 500 ng/l vykazovali významné narušenie sociálnych interakcií, ktoré sa prejavovalo oslabenou sociálnou afinitou, zväčšením vzdialenosti medzi jedincami a výrazným skrátením trvania vzájomného kontaktu. Tieto behaviorálne odchýlky korelovali so štrukturálnymi zmenami v nervovom tkanive, poukazujúcimi na poškodenie

centrálneho nervového systému, najmä v dôsledku zvýšenej apoptózy neurónov a následnej aktivácie mikroglíí. Získané údaje naznačujú, že prítomnosť BPA a jeho alternatív vo vodnom prostredí môže mať výrazný negatívny dopad na sociálne správanie rýb (Mu *et al.*, 2022). Vplyv na nervovú sústavu sa u *C. elegans* prejavuje najmä zmenou habituácie na mechanosenzorické stimuly. Nervový systém predstavuje z hľadiska počtu neurónov a ich diverzity najkomplexnejšie tkanivo organizmu *C. elegans*. Väčšina neurónov u *C. elegans* vykazuje komplexnú sieť prepojení s ostatnými neurónmi a často exprimuje prekvapivé spektrum signalizačných molekúl (White *et al.*, 1986). Tento nervový systém poskytuje *C. elegans* schopnosť modifikovať správanie na základe návykov a skúseností. Všeobecne sa koncept habituácie vzťahuje na postupný pokles odozvy na opakované podnety (Thompson a Spencer, 1966). Habituácia *C. elegans* na stimuly predného dotyku po expozícii rôznym koncentráciám BPA a BPS počas vývinu už bola v minulosti dokumentovaná. Výsledky týchto štúdií ukázali, že dospelé jedince, ktoré boli vystavené účinkom BPA počas embryogenézy, vyžadovali na dosiahnutie habituácie vyšší počet mechanosenzorických stimulov v porovnaní s neexponovanými embryami. Podobný fenomén bol pozorovaný aj u červov ovplyvnených BPS (Mersha *et al.*, 2015). Tieto výsledky sú v zhode s našimi zisteniami, ktoré potvrdili, že vystavenie *C. elegans* BPA a jeho analógom (BPS, BPF a BPAF) v koncentráciách 0,5, 1 a 5 μM viedlo k výraznému zvýšeniu počtu stimulov potrebných na dosiahnutie habituácie v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) (Graf 3). Porovnanie účinkov BPA a jeho náhrad odhalilo pri koncentráciách 0,5 μM a 1 μM (BPF aj BPAF) štatisticky významný nárast počtu dotykov potrebných na navodenie habituácie, čo poukazuje na potenciálne vyššiu neurotoxickú týchto substitútov v porovnaní s BPA (Graf 4) (Kaiglová *et al.*, 2025). Tieto zistenia korešpondujú s našimi predchádzajúcimi výsledkami, kde expozícia embryí oboch kmeňov *C. elegans* (WT aj mutantného kmeňa *bli-1*) látkam BPA a BPS viedla k signifikantne vyššej potrebe mechanosenzorických podnetov na dosiahnutie habituácie v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,05$) (Graf 9) (Kucharíková *et al.*, 2023). Uvedená korelácia medzi expozíciou a poruchami správania potvrdzuje predpoklad, že prechod na alternatívne bisfenoly nepredstavuje efektívne riešenie zdravotných rizík. Naopak, svedčí to o transformácii pôvodného problému do formy nových, štrukturálne príbuzných náhrad, ktoré vykazujú analogické, v niektorých prípadoch až závažnejšie nežiaduce účinky. Jedným z kľúčových cieľov ich negatívneho pôsobenia môže byť hormonálna sústava, kde môžu vyvolať nerovnováhu s ďalekosiahlymi následkami. Vo všeobecnosti je pre normálny rast nevyhnutné udržiavanie rovnováhy hormónov štítnej žľazy. Predpokladá sa, že BPA môže interferovať s fyziologickou funkciou rôznych biologických receptorov vrátane receptorov

hormónov štítnej žľazy (Acconcia *et al.*, 2015, Cimmino *et al.*, 2020). Narušenie homeostázy hormónov štítnej žľazy môže viesť k ovplyvneniu fyziologického rastu organizmu. Štúdia Zhanga *et al.* (2018) ukázala, že nielen BPA, ale aj jeho analógy BPS a BPF nepriaznivo ovplyvňujú postembryonálny vývin organizmu *C. elegans*. Deje sa tak prostredníctvom väzby na receptory hormónov štítnej žľazy, čím dochádza k narušeniu ich signalizačnej dráhy (Zhang, 2018). Naše experimenty boli v súlade s týmito zisteniami, keďže dĺžka jedincov typu „wild type“ *C. elegans*, ako aj mutantného kmeňa *bli-1* v štádiu L1 bola v porovnaní s kontrolnou skupinou významne znížená bez ohľadu to, či sme použili BPA alebo jeho náhradu BPS ($p < 0,05$) (Graf 6) (Kucharíková *et al.*, 2023). Aj v nasledujúcom pokuse naše zistenia ukázali, že nematódy *C. elegans* v larválnom štádiu L1 (18 hodín po nasadení pri teplote 20 °C) vykazovali signifikantne zníženú dĺžku tela po expozícii zvyšujúcim sa koncentráciám BPA (0,5, 1 a 5 μM) ($p < 0,01$), BPS (5 μM) ($p < 0,001$) a BPAF (1 a 5 μM) ($p < 0,05$), zatiaľ čo expozícia BPF nemala na dĺžku tela žiadny významný vplyv (Graf 5) (Kaiglová *et al.*, 2025).

V rámci našich nepublikovaných dát sme sa ďalej zamerali na hodnotenie účinkov bisfenolov BPA, BPS, BPF a BPAF v koncentráciách 0,5, 1 a 5 μM na ďalšie mutantné kmene *C. elegans* s utlmenými génmi podieľajúcimi sa na tvorbe kutikuly. Do analýzy sme zaradili mutanty *rol-1* a *rol-6*, ktoré majú utlmené rovnomenné gény kódujúce špecifické kutikulárne kolagény ovplyvňujúce štruktúru a mechanické vlastnosti kutikuly, ako aj mutant *sqt-1* so zníženou funkciou génu zodpovedného za správnu organizáciu a stabilitu kolagénových vlákien. Okrem týchto mutantov sme do štúdie zahrnuli aj nemutovaný kmeň *C. elegans* (WT).

Nové poznatky získané v rámci tejto štúdie priniesli ďalšie dôkazy o tom, že bisfenol A (BPA) a jeho štrukturálne analógy (BPS, BPF a BPAF) negatívne ovplyvňujú neurobehaviorálne prejavy a reprodukčnú schopnosť modelového organizmu *C. elegans*. Výskum habituálneho správania ukázal, že všetky testované látky narúšajú schopnosť hlístovcov privykať si na opakované mechanické stimuly. Tento proces sa prejavil koncentračne závislým nárastom počtu dotykov potrebných na dosiahnutie habituácie, čo bolo štatisticky vysoko signifikantné u kmeňa WT, ako aj u všetkých testovaných mutantných kmeňov v porovnaní s neexponovanou kontrolnou skupinou ($p < 0,01$ až $p < 0,001$) (Príloha 1, Graf 1A, 2A, 3A, 4A). Pri porovnaní náhrad so samotným BPA sa ukázalo, že najmä bisfenoly BPAF a BPF vykazujú v mnohých prípadoch silnejší inhibičný účinok na proces habituácie než pôvodný BPA, čo bolo obzvlášť zreteľné u kmeňov *rol-1* a *sqt-1* (Príloha 1, Graf 1B, 2B, 3B, 4B). Zistenie, že BPAF a BPF majú silnejší účinok ako BPA, je kritické. Habituácia je najjednoduchšia forma učenia. Ak bisfenoly zvyšujú počet stimulov potrebných na „vypnutie“ reakcie, znamená to,

že narúšajú synaptickú plasticitu alebo schopnosť neurónov spracovávať opakované podnety. Tieto zistenia o neurotoxícite dopĺňajú výsledky sledovania motility, kde expozícia bisfenolom viedla k výraznému zníženiu frekvencie ohybov tela. U kmeňa WT sa ako najsilnejší inhibítor pohybu pri najvyššej koncentrácii (5 μM) prejavil bisfenol BPAF ($p < 0,001$) (Príloha 2, Graf 1A). Podobne diferencovaný vplyv bol pozorovaný aj u mutantných kmeňov, kde napríklad kmeň *rol-1* reagoval na substitúty bisfenolov (BPAF, BPF, BPS) výrazným poklesom motorickej aktivity už od nižších koncentrácií (Príloha 2, Graf 2A), zatiaľ čo samotný BPA pri tomto kmeni nespôsobil významný pokles frekvencie pohybu. U kmeňa *rol-6* viedla expozícia všetkým typom bisfenolov k signifikantnému zníženiu motility ($p < 0,01$ až $p < 0,001$) (Príloha 2, Graf 3A). V prípade kmeňa *sqt-1* výsledky naznačujú, že náhrady BPA neponúkajú z hľadiska akútnej neurotoxicity žiadnu výhodu oproti pôvodnej látke, nakoľko signifikantné účinky boli pri BPAF a BPF pozorované už pri koncentrácii 0,5 μM ($p < 0,001$) (Príloha 2, Graf 4A, 4B). Výrazne vyššia toxicita bisfenolu BPAF v porovnaní s pôvodným BPA, ktorú sme pozorovali pri testoch motility a habituácie, úzko súvisí s jeho špecifickou chemickou štruktúrou. Kľúčovým rozdielom je prítomnosť fluorovaných metylových skupín, ktoré nahrádzajú štandardné metylové skupiny v molekule BPA. Táto substitúcia fluórom zásadne zvyšuje hydrofobicitu molekuly, čo uľahčuje pasívny transport látky cez lipidové dvojvrstvy bunkových membrán a kutikulu *C. elegans*. Okrem lepšieho prieniku do buniek spôsobuje elektronegativita atómov fluóru silnejšiu väzbovú afinitu k estrogénovým receptorom a iným cieľovým proteínom v nervovej sústave, čo vysvetľuje markantné narušenie neurobehaviorálnych procesov už pri nízkych koncentráciách. Vyššia metabolická stabilita väzby C-F zároveň znamená, že BPAF je v organizme odolnejší voči degradácii, čo vedie k jeho dlhšiemu pôsobeniu na neuromuskulárny aparát hlístovcov (Choi a Lee, 2017).

V oblasti reprodukčnej toxicity výskum potvrdil, že expozícia bisfenolom vedie k celkovému poklesu liahnivosti embryí. U kmeňa WT bol zaznamenaný signifikantný pokles liahnivosti pri všetkých testovaných látkach v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,05$ až $p < 0,01$) (Príloha 3, Graf 1A), pričom bisfenol BPAF v porovnaní s BPA vykazoval výrazné zníženie liahnivosti už pri koncentrácii 1 μM (Príloha 3, Graf 1B). U mutantných kmeňov sa ako najrizikovejší opäť javil bisfenol BPAF, ktorý spôsobil signifikantné zníženie liahnivosti oproti kontrolnej neexponovanej skupine už pri najnižšej koncentrácii, a to pri kmeňoch *rol-1* (Príloha 3, Graf 2A), *rol-6* (Príloha 3, Graf 3A) aj *sqt-1* (Príloha 3, Graf 4A). Pozoruhodné je zistenie u kmeňa *sqt-1*, kde expozícia pôvodnému BPA nespôsobila žiadne významné zmeny liahnivosti, avšak jeho substitút BPAF vyvolal signifikantné zníženie tohto parametra v porovnaní s BPA (Príloha 3, Graf 4B).

Výsledky získané na mutantných kmeňoch *C. elegans* poukazujú na rozdielnu mieru behaviorálnych a vývinových účinkov bisfenolov v porovnaní s kmeňom WT. Sledované kmene nesú geneticky podmienené poruchy ovplyvňujúce neuromuskulárnu koordináciu a štruktúru kutikuly, čo sa v rámci tejto štúdie prejavilo zvýšenou náchylnosťou organizmu na pôsobenie testovaných látok. Tieto zistenia podporujú hypotézu, že genetické faktory zásadne modulujú odpoveď organizmu na environmentálnu chemickú expozíciu.

Kmeň *rol-1* vykazoval výrazné narušenie habituácie, najmä po expozícii bisfenolovým substitútom BPA, konkrétne BPS, BPAF a BPF ($p < 0,001$) (Príloha 1, Graf 2A). Tento efekt naznačuje zvýšenú citlivosť nervovo-svalovej signalizácie na chemické zásahy, čím sa kmeň *rol-1* javí ako mimoriadne vhodný model na detekciu jemných neurotoxických účinkov chemických látok. Naopak, kmeň *rol-6* reagoval na všetky testované bisfenoly konzistentným poklesom motility a liahnivosti, čo poukazuje na jeho vysokú citlivosť na všeobecnú toxicitu a robí z neho vhodný nástroj pre skrínigové toxikologické hodnotenie (Príloha 2, Graf 3A, Príloha 3, Graf 3A).

V prípade kmeňa *sqt-1* boli účinky BPA menej výrazné, zatiaľ čo jeho substitúty, predovšetkým BPAF, vyvolali signifikantné zníženie motility ($p < 0,001$) (Príloha 2, Graf 4) aj liahnivosti ($p < 0,05$) (Príloha 3, Graf 4A). Tento rozdiel poukazuje na možnú úlohu chemickej štruktúry jednotlivých bisfenolov pri ich interakcii s kutikulárnymi komponentmi a naznačuje existenciu štruktúrne podmienených rozdielov v toxicite medzi jednotlivými zlúčeninami.

Kutikula *C. elegans* predstavuje komplexnú extracelulárnu maticu tvorenú viacerými typmi kolagénov s rozdielnou funkčnou a priestorovou organizáciou. Poruchy jednotlivých kolagénových komponentov môžu viesť k rozdielnym zmenám mechanických vlastností kutikuly, ako aj k alterácii jej bariérovej funkcie a permeability pre chemické látky. Z tohto pohľadu je kľúčové identifikovať, ktoré typy kolagénov majú rozhodujúci vplyv na prienik exogénnych látok a následnú citlivosť organizmu voči chemickej expozícii.

Použitie ďalších kolagénových mutantných línií by mohlo významne prispieť k hlbšiemu pochopeniu vzťahu medzi špecifickými štrukturálnymi zmenami kutikuly a biologickými účinkami bisfenolov. Z hľadiska ďalšieho výskumu sa preto javí ako nevyhnutné zamerať sa na podrobné objasnenie molekulárnych mechanizmov, ktorými bisfenoly narušajú štrukturálnu integritu kolagénov u mutantných kmeňov typu *rol-1*, *rol-6* a *sqt-1*. Budúce štúdie by mali preskúmať, či expozícia týmito látkam priamo ovplyvňuje expresiu génov kódujúcich kľúčové kutikulárne proteíny, čo by mohlo vysvetliť pozorovanú synergiu medzi genetickou predispozíciou a environmentálnou toxicitou.

Poznatky získané v rámci našich štúdií predstavujú dôležitý príspevok k objektívnemu hodnoteniu rizík nových chemických látok. Zároveň zdôraz-

ňujú naliehavú potrebu transformovať procesy posudzovania rizík do striktných regulačných mechanizmov, ktoré musia prioritne zohľadňovať dlhodobé zdravotné dopady expozície bisfenolom. V praxi by to malo znamenať zavedenie povinného viacstupňového skríningu so zameraním na endokrinnú disruptivitu a epigenetické zmeny ešte pred schválením akejkoľvek náhrady na trh. Takáto regulácia musí vyžadovať preukázanie zdravotnej bezpečnosti náhradných analógov na úrovni, ktorá vylučuje narušenie hormonálnej homeostázy, čím by sa zabránilo nekontrolovanému zavádzaniu látok s podobným patofyziologickým profilom, aký bol zdokumentovaný pri BPA. Len integráciou týchto preventívnych kritérií do legislatívy bude možné efektívne minimalizovať riziko chronických ochorení spojených s masovou priemyselnou produkciou neoverených chemických alternatív.

ZÁVER

Predložená monografia poskytuje komplexnú syntézu súčasných vedeckých poznatkov a výsledkov nášho vlastného výskumu zameraného na environmentálne a zdravotné výzvy spojené s masovou produkciou a používaním plastov v modernej spoločnosti. Hoci úrad EFSA v roku 2023 pristúpil k radikálnemu sprísneniu limitov pre BPA, údaje z vedeckej literatúry, ako aj naše zistenia, sú v súlade s nemonotónnou krivkou závislosti účinku od dávky a naznačujú, že zdravotné riziká pretrvávajú aj pri nízkych koncentráciách. Ťažiskom práce bolo posúdenie nežiaducich účinkov BPA a jeho štrukturálnych analógov (BPS, BPF, BPAF), ktoré sú často marketingovo označované ako „BPA-free“ s cieľom zvýšiť dôveru spotrebiteľa. V praxi však toto označenie často znamená len nahradenie BPA inými bisfenolmi, ktoré môžu mať rovnaké alebo závažnejšie nepriaznivé účinky, čo naše výsledky na modelovom organizme *C. elegans* potvrdzujú ako fenomén tzv. nežiaducich náhrad („*regrettable substitution*“). Experimentálne sme v súlade s literárnymi trendmi potvrdili, že všetky testované bisfenoly signifikantne znižujú reprodukčnú kapacitu a mieru liahnutia, a to aj pri najnižších koncentráciách. Originálnym prínosom našich štúdií, ktorý rozširuje doterajšie poznanie, je využitie mutantných kmeňov so špecifickými poruchami kutikuly (*bli-1*, *rol-1*, *rol-6*, *sqt-1*) ako citlivých biosenzorov environmentálneho stresu. Všetky bisfenoly mali výraznejší účinok na tieto kmene s defektmi v produkcii kolagénu v porovnaní s kmeňom WT, čo potvrdzuje, že zmeny v priepustnosti bariéry zásadne ovplyvňujú citlivosť organizmu. Vzhľadom na nemonotónny priebeh biologickej aktivity sú tieto citlivé kmene vysoko relevantné pri analýze škodlivosti bisfenolov už pri nízkej expozícii. V oblasti neurotoxicity naše dáta poukazujú na závažné narušenie procesu habituácie na mechanosenzorické stimuly a deficit v neasociatívnom učení. Znepokojivým zistením, ktoré korešponduje s vedeckou diskusiou, je fakt, že analógy BPF a BPAF vykazovali pri nižších koncentráciách potenciálne vyššiu neurotoxicitu než samotný BPA. Zároveň sme potvrdili negatívny dopad na postembryonálny vývin, pričom bisfenoly pravdepodobne interferenciou so signalizačnou dráhou hormónov štítnej žľazy viedli k významnému zníženiu telesnej dĺžky jedincov. Tieto poznatky zdôrazňujú naliehavú potrebu objektivizovať procesy posudzovania rizík a zabezpečiť, aby sa každá bisfenolová náhrada podrobila detailnému skríningu predtým, než dôjde k jej masovej priemyselnej produkcii, čím by sa minimalizovalo riziko opakovania negatívnych scenárov známych pri BPA.

REFERENCIE

1. ABRAHAM, A. a CHAKRABORTY, P., 2020. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev. Environ. Health* 35, 201–210 (2020). DOI: 10.1515/reveh-2019-0034.
2. ACCONCIA, F., PALLOTTINI, V. a MARINO, M., 2015. Molecular mechanisms of action of BPA. *Dose-Response* 13, 1–9 (2015). DOI: 10.1177/1559325815610582
3. AHN, C. a JEUNG, E.B., 2023. Endocrine-Disrupting Chemicals and Disease Endpoints. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 5342 (2023). DOI: 10.3390/ijms24065342.
4. AKASH, M.S.H. *et al.*, 2020. Bisphenol A-induced metabolic disorders: From exposure to mechanism of action. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 77, 103373 (2020). DOI: 10.1016/j.etap.2020.103373.
5. ALONSO-MAGDALENA, P. *et al.*, 2010. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ. Health Perspect.* 118, 1243–1250 (2010). DOI: 10.1289/ehp.1001993.
6. ALTUN, Z.F. a HALL, D.H., 2009. Introduction to *C. elegans* anatomy. In: *WormAtlas* (2009). DOI: 10.3908/wormatlas.1.1.
7. AMANO, I. *et al.*, 2018. Effects of mild perinatal hypothyroidism on cognitive function of adult male offspring. *Endocrinology* 159, 1910–1921 (2018). DOI: 10.1210/en.2017-03125
8. AMBROS, V. a HORVITZ, H.R., 1987. The *Lin-14* Locus of *Caenorhabditis-Elegans* Controls the Time of Expression of Specific Post-embryonic Developmental Events. *Genes Dev.* 1, 398–414 (1987). DOI: 10.1101/gad.1.4.398.
9. AMRIT, F.R., RATNAPPAN, R., KEITH, S.A. a GHAZI, A., 2014. The *C. elegans* lifespan assay toolkit. *Methods.* 68, 465–475 (2014). DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.04.002
10. ANNE, B. a RAPHAEL, R., 2021. Endocrine Disruptor Chemicals. In: FEINGOLD, K.R. *et al.* (eds). *Endotext* (Internet). South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. (2000–). [cit. 3.1.2026]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK569327/>
11. ANTEBI, A., 2006. Nuclear hormone receptors in *C. elegans*. *WormBook*, 1–13 (2006). DOI: 10.1895/wormbook.1.64.1.
12. AXELSTAD, M. *et al.*, 2018. EDC IMPACT: reduced sperm counts in rats exposed to human relevant mixtures of endocrine disrupters. *Endocr. Connect.* 7, 139–148 (2018). DOI: 10.1530/EC-17-0307.
13. BADDING, M.A. *et al.*, 2019. CLARITY-BPA Core Study: Analysis for non-monotonic dose-responses and biological relevance. *Food Chem. Toxicol.* 131, 110554 (2019). DOI: 10.1016/j.fct.2019.06.001
14. BANADERAKHSHAN, R. *et al.*, 2022. Bisphenol A and its alternatives in Austrian thermal paper receipts, and the migration from reusable plastic drinking bottles into water and artificial saliva using UHPLC-MS/MS. *Chemosphere* 286, 131842 (2022). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131842.
15. BAUMEISTER, R. a GE, L., 2002. The Worm in Us - *Caenorhabditis Elegans* as a Model of Human Disease. *Trends Biotechnol.* 20, 147–148 (2002). DOI: 10.1016/S0167-7799(01)01925-4.
16. BAUMEISTER, R., SCHAFFITZEL, E. a HERTWECK, M., 2006. Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *J. Endocrinol.* 190, 191–202 (2006). DOI: 10.1677/joe.1.06856
17. BEHNIA, F., PELTIER, M., GETAHUN, D., WATSON, C., SAADE, G. a MENON, R., 2016.

- High bisphenol A (BPA) concentration in the maternal, but not fetal, compartment increases the risk of spontaneous preterm delivery. *J. Matern. Neonatal. Med.* 29 (2016), s. 3583–3589. DOI 10.3109/14767058.2016.1139570.
18. BIEDERMANN, S., TSCHUDIN, P. a GROB, K., 2010. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 571–576 (2010). DOI: 10.1007/s00216-010-3936-9.
19. BOYD, W.A., MCBRIDE, S.J. a FREEDMAN, J.H., 2007. Effects of Genetic Mutations and Chemical Exposures on *Caenorhabditis Elegans* Feeding. *PLoS One* 2, e1259 (2007). DOI: 10.1371/journal.pone.0001259.
20. BRADFORD, B.R. *et al.*, 2020. Neonicotinoid-Containing Insecticide Disruption of Growth, Locomotion, and Fertility in *Caenorhabditis Elegans*. *PLoS One* 15, e0238637 (2020). DOI: 10.1371/journal.pone.0238637.
21. BRAUN, J.M., 2017. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 161–173 (2017). DOI: 10.1038/nrendo.2016.186.
22. BREHM, E. a FLAWS, J.A., 2019. Transgenerational Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Male and Female Reproduction. *Endocrinology* 160, 1421–1435 (2019). DOI: 10.1210/en.2019-00034.
23. BRENNER, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94 (1974). DOI: 10.1093/genetics/77.1.71.
24. BUCKINGHAM, S. D. a D. B. SATTELLE, 2009. Fast, Automated Measurement of Nematode Swimming (Thrashing) without Morphometry. *BMC Neuroscience*. 10(1), 84. ISSN 1471-2202. DOI 10.1186/1471-2202-10-84.
25. BUOSO, E. *et al.*, 2021. Effects of Bisphenols on RACK1 Expression and Their Immunological Implications in THP-1 Cells. *Front. Pharmacol.* 12, 743991 (2021). DOI: 10.3389/fphar.2021.743991.
26. BUOSO, E. *et al.*, 2025. Endocrine Disrupting Toxicity of Bisphenol A and Its Analogs: Implications in the Neuro-Immune Milieu. *J. Xenobiot.* 15, 13–31 (2025). DOI: 10.3390/jox15010003.
27. CALSOLARO, V., PASQUALETTI, G., NICCOLAI, F., CARACCIO, N. a MONZANI, F., 2017. Thyroid Disrupting Chemicals. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2583 (2017). DOI: 10.3390/ijms18122583.
28. CAMACHO, J., TRUONG, L., KURT, Z., CHEN, Y.W., MORSELLI, M., GUTIERREZ, G., PELLEGRINI, M., YANG, X. a ALLARD, P., 2018. The Memory of Environmental Chemical Exposure in *C. Elegans* Is Dependent on the Jumonji Demethylases Jmjd-2 and Jmjd-3/Utx-1. *Cell Rep.* 23, 2392–2404 (2018). DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.078.
29. CANO-NICOLAU, J. *et al.*, 2016. Estrogenic Effects of Several BPA Analogs in the Developing Zebrafish Brain. *Front. Neurosci.* 10, 112 (2016). DOI: 10.3389/fnins.2016.00112.
30. CANO-SANCHO, G., SALMON, A.G. a LA MERRILL, M.A., 2017. Association between exposure to p,p'-DDT and its metabolite p,p'-DDE with obesity: integrated systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 125, 096002 (2017). DOI: 10.1289/EHP1318.
31. CARPENTER, D.O., 2006. Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health. *Rev. Environ. Health* 21, 1–23 (2006). DOI: 10.1515/REVEH.2006.21.1.1.
32. CELIK, M.N. a YESILDEMIR, O., 2025. Endocrine Disruptors in Child Obesity and Related Disorders: Early Critical Windows of Exposure. *Curr. Nutr. Rep.* 14, 14–25 (2025). DOI: 10.1007/s13668-024-00604-1.
33. ÇİFTÇİ, S., YALÇIN, S.S. a SAMUR, G., 2021. Bisphenol A exposure in exclusively breastfed infants and lactating women: An observational cross-sectional study. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.*, 13(4), pp. 375–383. DOI: 10.4274/jcrpe.galenos.2020.2021.0305.

34. CIMMINO, I., FIORY, F., PERRUOLO, G., MIELE, C., BEGUINOT, F., FORMISANO, P. a ORIENTE, F., 2020. Potential mechanisms of bisphenol a (BPA) contributing to human disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020), s. 1–22. DOI 10.3390/ijms21165761.
35. CORSI, A.K., CHALFIE, M. a WIGHTMAN, B., 2015. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 200, 387–407 (2015). DOI: 10.1534/genetics.115.176099.
36. COSTA, H.E. a CAIRRAO, E., 2024. Effect of bisphenol A on the neurological system: a review update. *Arch. Toxicol.* 98(1), 1–73 (2024). DOI: 10.1007/s00204-023-03614-0.
37. CROMBIE, T.A., CHIKUTURUDZI, C., COOK, D.E. a ANDERSEN, E.C., 2022. An Automated Approach to Quantify Chemotaxis Index in *C. Elegans*. *MicroPubl. Biol.* 2022, (2022). DOI: 10.17912/micropub.biology.000567.
38. DAVID J. *et al.*, 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 (1995), s. 835–839. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90199-x. - xxx
39. DAVIS, G.M., HIPWELL, H. a BOAG, P.R., 2023. Oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Sex. Dev.* 17, 73–83 (2023). DOI: 10.1159/000531019.
40. DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J.P., GIUDICE, L.C., HAUSER, R., PRINS, S.G., SOTO, A.M., ZOEKKER, R.T. a GORE, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342 (2009). DOI: 10.1210/er.2009-0002.
41. DODDS, E. C. a LAWSON, W., 1936. Molecular structure in relation to oestrogenic activity: compounds without a phenanthrene nucleus. *Proc. Royal Soc. B: Biological Sciences.* 120 (817), s. 502–515.
42. DOENCH, J. G., C. P. PETERSEN a A. SHARP, 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes & Development.* 17(4), 438–442. ISSN 0890-9369. DOI 10.1101/gad.1064703.
43. DU, J. *et al.*, 2024. The toxic effects and mechanisms of maternal exposure to Bisphenol F during gestation and lactation on lungs in female offspring mice. *Environ. Pollut.* 361, 124800 (2024). DOI: 10.1016/j.envpol.2024.124800.
44. DZIEWECZYNSKI, T. a HEBERT, O., 2013. The effects of short-term exposure to an endocrine disrupter on behavioural consistency in male juvenile and adult Siamese fighting fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 316–326 (2013). DOI: 10.1007/s00244-012-9820-1.
45. EFSA PANEL ON FOOD CONTACT MATERIALS, ENZYMES AND PROCESSING AIDS (CEP) e., 2023. Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA J.* 21, e06857 (2023). DOI: 10.2903/j.efsa.2023.6857.
46. EFSA PANEL ON FOOD CONTACT MATERIALS, ENZYMES, FLAVOURINGS AND PROCESSING AIDS (CEF), 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA J.* 13, 3978 (2015). DOI: 10.2903/j.efsa.2015.3978.
47. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY (ECHA), 2021. Assessment of Regulatory Needs for Bisphenols. Helsinki: European Chemicals Agency (2021) [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: <https://echa.europa.eu/assessment-regulatory-needs>
48. ELADAK, S. *et al.*, 2015. A new chapter in the bisphenol A story: Bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil. Steril.* 103, 11–21 (2015). DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.11.005
49. ELLIS, H.M. a HORVITZ, H.R., 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 44, 817–829 (1986). DOI: 10.1016/0092-8674(86)90004-8.
50. ENDOCRINE SOCIETY, 2023. Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union. Washington, DC: Endocrine Society (2023) [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: <https://www.endocrine.org/advocacy/position-statements/endocrine-disrupting-chemicals-in-the-european-union>

51. EUROPEAN COMMISSION, 2011. EU ban on use in baby bottles enters into force next week. Brussels: European Commission (2011) [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_11_229
52. EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY (EEA), 2023. Human exposure to Bisphenol A in Europe (2023) [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: <https://www.eea.europa.eu/publications/peoples-exposure-to-bisphenol-a/human-exposure-to-bisphenol-a>
53. EUROPEAN ENVIRONMENTAL AGENCY (EEA), 1996. European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife: Weybridge 1996 report. In: Environment and climate research programme DX (1996) [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: http://www.iehconsulting.co.uk/IEH_Consulting/IEHCPubs/EndocrineDisrupters/WEYBRIDGE.pdf
54. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY (ECHA), 2017a. MSC unanimously agrees that Bisphenol A is an endocrine disruptor. Helsinki: ECHA (2017) [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: <https://echa.europa.eu/-/msc-unanimously-agrees-that-bisphenol-a-is-an-endocrine-disruptor>
55. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY (ECHA), 2017b. Strategy to promote substitution to safer chemicals through innovation. Helsinki: European Chemicals Agency (2017) [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: https://echa.europa.eu/documents/10162/13630/substitution_strategy_en.pdf
56. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY (ECHA), 2023. ECHA adds nine hazardous chemicals to Candidate List. Helsinki: ECHA (2023) [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: <https://echa.europa.eu/-/echa-adds-nine-hazardous-chemicals-to-candidate-list>
57. FÉNICHÉL, P., SULTAN, C., TEROU, G., COOCHE, N. a DECHAUD, H., 2019. Endocrine Disrupting Chemicals Interfere With Leydig Cell Hormone Pathways During Testicular Descent in Idiopathic Cryptorchidism. *Front. Endocrinol.* 9, 851 (2019). DOI: 10.3389/fendo.2018.00786.
58. FICOCIELLO, G., GERARDI, V., UCCELLETTI, D. a SETINI, A., 2021. Molecular and Cellular Responses to Short Exposure to Bisphenols A, F, and S and Eluates of Microplastics in *C. Elegans*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 805–818 (2021). DOI: 10.1007/s11356-020-10498-5.
59. FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S.E., MELLO, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, roč. 391, č. 6669, s. 806–811. DOI: 10.1038/35888.
60. FOOD PACKAGING FORUM. Sweden bans BPA in water pipes. 2016, 22. júla. Dostupné na: <https://foodpackagingforum.org/news/sweden-bans-bpa-in-water-pipes>
61. FRANKO, N., A. KODILA a M. SOLLNER DOLENC, 2024. Adverse outcomes of the newly emerging bisphenol A substitutes. *Chemosphere.* 364, 143147. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2024.143147.
62. FRÉZAL, L., FÉLIX, M.A., 2015. *C. elegans* outside the Petri dish. *eLife* 4, e05849 (2015). DOI: 10.7554/elife.05849
63. GAO, C.J. a KANNAN, K., 2020. Phthalates, bisphenols, parabens, and triclocarban in feminine hygiene products from the United States and their implications for human exposure. *Environ. Int.* 136, 105465 (2020). DOI: 10.1016/j.envint.2020.105465.
64. GARCÍA-ESPIÑEIRA, M.C., TEJEDA-BENÍTEZ, L.P. a OLIVERO-VERBEL, J., 2018. Toxic Effects of Bisphenol A, Propyl Paraben, and Triclosan on *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 15(4), 684 (2018). DOI: 10.3390/ijerph15040684.
65. GARCÍA-RECIO, E. *et al.*, 2023. Effects of bisphenol F, bisphenol S, and bisphenol AF on cultured human osteoblasts. *Arch. Toxicol.* 97, 1899–1905 (2023). DOI: 10.1007/s00204-023-03523-2.
66. GAUR, A. V. a R. AGARWAL, 2021. Risperidone Induced Alterations in Feeding and Locomotion Behavior of *Caenorhabditis Elegans*. *Current Research in Toxicology.* 2, 367–374. DOI: 10.1016/j.crtox.2021.10.003.

67. GEENS, T., APELBAUM, T.Z., GOEYENS, L., NEELS, H. a COVACI, A., 2010. Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food Addit. Contam. - Part A*. 27 (2010), s. 1627–1637. DOI 10.1080/19440049.2010.508183.
68. GEENS, T., GOEYENS, L. a COVACI, A., 2011. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *Int J Hyg Environ Health*. 214 (5), s. 339–347. DOI 10.1016/j.ijheh.2011.04.005.
69. GERISCH, B., WEITZEL, C., PANTHER, C., ABU-QUDAH, E., NORYS, C., BERNASCONI-CAVALIERI, F., DEUTSCH, M., FU, D.J. a ANTEBI, A., 2007. A Bile Acid-like Steroid Modulates *Caenorhabditis Elegans* Lifespan through Nuclear Receptor Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5014–5019 (2007). DOI: 10.1073/pnas.0700847104.
70. GERMOGLIO, M., ADAMO, A., INCERTI, G., CARTENÌ, F., GIGLIOTTI, S., STORLAZZI, A. a MAZZOLENI, S., 2022. Self-DNA Exposure Induces Developmental Defects and Germline DNA Damage Response in *Caenorhabditis Elegans*. *Biology (Basel)* 11, 262 (2022). DOI: 10.3390/biology11020262.
71. GHASSABIAN, A. a TRASANDE, L., 2018. Disruption in thyroid signaling pathway: a mechanism for the effect of endocrine-disrupting chemicals on child neurodevelopment. *Front. Endocrinol.* 9, 204 (2018). DOI: 10.3389/fendo.2018.00204.
72. GIULIVO, M., LOPEZ DE ALDA, M., CAPRI, E. a BARCELÓ, D., 2016. Human exposure to endocrine disrupting compounds: their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ. Res.* 151, 251–264 (2016). DOI: 10.1016/j.envres.2016.07.011.
73. GOLDEN, J.W. a RIDDLE, D.L., 1984. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Dev. Biol.* 102, 368–378 (1984). DOI: 10.1016/0012-1606(84)90201-x.
74. GORE, A.C., CHASSY, C., PADDY, D.T., DIAMANTI-KANDARAKIS, E. *et al.*, 2015. EDC-2: The Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* 36, E1–E150 (2015). DOI: 10.1210/er.2015-1010.
75. GOULD, J.C., LEONARD, L.S., MANESS, S.C., WAGNER, B.L., CONNER, K., ZACHAREWSKI, T.,... SAFE, S.H., 1998. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol. Endocrinol.* 12, 333–342 (1998). DOI: 10.1016/s0303-7207(98)00084-7
76. GREGORY, R. I. a R. SHIEKHNATTAR, 2005. MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer Research*. 65(9), 3509–3512. ISSN 0008-5472. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-05-0298.
77. GRÜN, F. a BLUMBERG, B., 2009. Endocrine disrupters as obesogens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 19–29 (2009). DOI: 10.1016/j.mce.2009.02.018.
78. GUO, R., DU, Y., ZHENG, F., WANG, J., WANG, Z., JI, R. a CHEN, J., 2017. Bioaccumulation and elimination of bisphenol a (BPA) in the alga *Chlorella pyrenoidosa* and the potential for trophic transfer to the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environ. Pollut.* 227, 460–467 (2017). DOI: 10.1016/j.envpol.2017.05.010.
79. HA, N. M. *et al.*, 2022. *Caenorhabditis Elegans* as a Powerful Tool in Natural Product Bioactivity Research. *Applied Biological Chemistry*. 65(1), 1–18. DOI: 10.1186/s13765-022-00685-y.
80. HAMAMBA, N., JIE, L., WEI, Z.X., QIN, Z.C., SARPONG, F. a HUA, Z.X., 2020. Effects of Treatment with Different Combinations of Bisphenol Compounds on the Mortality of *Caenorhabditis Elegans*. *Biomed. Environ. Sci.* 33, 145–149 (2020). DOI: 10.3967/bes2020.020.
81. HAN, C. a HONG, Y.C., 2016. Bisphenol A, hypertension, and cardiovascular diseases: epidemiological, laboratory, and clinical trial evidence. *Curr. Hypertens. Rep.* 18 (2016), s. 1–5. DOI 10.1007/s11906-015-0617-2.
82. HARLOW, P., PERRY, S., WIDDISON, S., *et al.* (2016). The nematode *Caenorhabditis ele-*

- gans as a tool to predict chemical activity on mammalian development and identify mechanisms influencing toxicological outcome. *Sci Rep*, roč. 6, 22965. DOI: 10.1038/srep22965.
83. HASHMI, S., WANG, Y., PARHAR, R.S., COLLISON, K.S., CONCA, W., AL-MOHANNA, F. a GAUGLER, R., 2013. A *C. elegans* model to study human metabolic regulation. *Nutr. Metab. (Lond)*. 10(1), 31 (2013). DOI: 10.1186/1743-7075-10-31.
 84. HAYES, T.B., KHOURY, V., NARAYAN, A., GALLIPEAU, M., MANCL, R., COX, C., JENSEN, N. a NORIEGA, L., 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4612–4617 (2010). DOI: 10.1073/pnas.090951910.
 85. HERING, I., LE, D.T. a VON MIKECZ, A., 2022. Age-Resolved Fitness Tests in the Animal Model *Caenorhabditis Elegans* - a Step-by-Step Protocol. *EXCLI J.* 21, 344–361 (2022). DOI: 10.17179/excli2021-4626.
 86. HILLIARD, M.A., BARGMANN, C.I. a BAZZICALUPO, P., 2002. *C. elegans* Responds to Chemical Repellents by Integrating Sensory Inputs from the Head and the Tail. *Curr. Biol.* 12, 730–734 (2002). DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00813-8.
 87. HOPEWELL, H., FLOYD, K.G., BURNELL, D., HANCOCK, J.T., ALLAINGUILLAUME, J., LADOMERY, M.R. a WILSON, I.D., 2017. Residual Ground-Water Levels of the Neonicotinoid Thiacloprid Perturb Chemosensing of *Caenorhabditis Elegans*. *Ecotoxicology* 26, 981–990 (2017). DOI: 10.1007/s10646-017-1826-z.
 88. HORNOS CARNEIRO, M. F. *et al.*, 2020. Antioxidant CoQ10 Restores Fertility by Rescuing Bisphenol A-Induced Oxidative DNA Damage in the *Caenorhabditis Elegans* Germline. *Genetics*. 214(2), 381–395. DOI: 10.1534/genetics.119.302939.
 89. HUEZA, I.M., LATORRE, A.O., ZORZELLA-PEZZA, M.C. a LATORRE, M.R., 2014. Zea-ralenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. *Toxins (Basel)* 6, 1080–1095 (2014). DOI: 10.3390/toxins6031080.
 90. HUNT, P.R., 2017. The *C. Elegans* Model in Toxicity Testing. *J. Appl. Toxicol.* 37, 50–59 (2017). DOI: 10.1002/jat.3357.
 91. HUSØY, T. *et al.*, 2019. The Norwegian biomonitoring study from the EU project EuroMix. *Environ. Int.* 132, 105103 (2019). DOI: 10.1016/j.envint.2019.105103.
 92. HUTVÁGNER, G. a P. D. ZAMORE, 2002. RNAi: nature abhors a double-strand. *Current Opinion in Genetics & Development*. 12(2), 225–232. ISSN 0959-437X. DOI 10.1016/S0959-437X(02)00290-3.
 93. HYUN, M. *et al.*, 2021. Comparative Toxicities of BPA, BPS, BPF, and TMBPF in the Nematode *Caenorhabditis Elegans* and Mammalian Fibroblast Cells. *Toxicology*. 461, 152924. DOI: 10.1016/j.tox.2021.152924.
 94. CHEN, D. *et al.*, 2016a. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environmental Science & Technology*. 50(11), 5438–5453. DOI: 10.1021/acs.est.5b05387.
 95. CHEN, Y. *et al.*, 2016b. Exposure to the BPA-Substitute Bisphenol S Causes Unique Alterations of Germline Function. *PLoS Genetics* 12, e1006223 (2016). DOI: 10.1371/journal.pgen.1006223.
 96. CHEN, H., WANG, C., LI, H., MA, R., YU, Z., LI, L., XIANG, M., CHEN, X., HUA, X. a YU, Y., 2019. A review of toxicity induced by persistent organic pollutants (POPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Environ. Manag.* 237, 519–525 (2019). DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.02.102.
 97. CHEN, F., JIANG, F., MA, J., ALGHAMDI, M.A., ZHU, Y. a YONG, J.W.H., 2024. Intersecting planetary health: Exploring the impacts of environmental stressors on wildlife and human health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 283, 116848 (2024). DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116848.
 98. CHOI, Y. a LEE, L. S., 2017. Partitioning Behavior of Bisphenol Alternatives BPS and BPAF

- Compared to BPA. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7418–7425 (2017). DOI: 10.1021/acs.est.6b05902.
99. IJOMONE, O. M. *et al.*, 2021. Application of Fluorescence Microscopy and Behavioral Assays in *C. Elegans*. *Neuromethods*. 172, 399–426. DOI: 10.1007/978-1-0716-1637-6_18.
 100. IMANIKIA, S., F. GALEA, E. NAGY, D. H. PHILLIPS, S. R. STÜRZENBAUM a V. M. ARLT. The Application of the Comet Assay to Assess the Genotoxicity of Environmental Pollutants in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016, roč. 45, s. 356–361. ISSN 1382-6689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2016.06.020
 101. INDONG, R.A., PARK, J.M., HONG, J.K., LYOU, E.S., HAN, T., HONG, J.K., LEE, T.K. a LEE, J.I., 2024. A Simple Protocol for Cultivating the Bacterivorous Soil Nematode *Caenorhabditis Elegans* in Its Natural Ecology in the Laboratory. *Front. Microbiol.* 15, 1347797 (2024). DOI: 10.3389/fmicb.2024.1347797.
 102. ISTIBAN, M.N., DE FRUYT, N., KENIS, S. a BEETS, I., 2024. Evolutionary Conserved Peptide and Glycoprotein Hormone-like Neuroendocrine Systems in *C. Elegans*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 584, 112162 (2024). DOI: 10.1016/j.mce.2024.112162.
 103. JAMESON, J.L., 2016. *Endocrinology: Adult & Pediatric*. 7. vyd. Philadelphia: Elsevier Saunders (2016).
 104. JENSEN, T.K. *et al.* 2019. Prenatal bisphenol A exposure is associated with language development but not with ADHD-related behavior in toddlers from the Odense Child Cohort. *Environ. Res.* 170 (2019), s. 398–405. DOI 10.1016/j.envres.2018.12.055.
 105. JI, H., MIAO, M., LIANG, H., SHI, H., RUAN, D., LI, Y., WANG, J. a YUAN, W., 2018. Exposure of environmental Bisphenol A in relation to routine sperm parameters and sperm-movement characteristics among fertile men. *Sci. Rep.* 8 (2018), s. 1–9. DOI 10.1038/s41598-018-35787-5.
 106. JIN, H. a ZHU, L., 2016. Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in water and sediment from Liaohe River Basin and Taihu Lake, China. *Water Res.* 103, 343–351 (2016). DOI: 10.1016/j.watres.2016.07.059.
 107. JOHANSSON, H.K.L., SARAWI, J.P., BAKER, V.L. a NILSSON, E.E., 2017. Environmental influences on ovarian dysgenesis — developmental windows sensitive to chemical exposures. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 400–414 (2017). DOI: 10.1038/nrendo.2017.36.
 108. JUNGE, K.M. *et al.*, 2018. MEST mediates the impact of prenatal bisphenol A exposure on long-term body weight development. *Clin. Epigenet.* 10, 58 (2018). DOI: 10.1186/s13148-018-0478-z.
 109. KAIGLOVÁ, A., BÁRDYOVÁ, Z., HOCKICKOVÁ, P., ZVOLENSKÁ, A., MELNIKOV, K. a KUCHARÍKOVÁ, S., 2025. *Caenorhabditis Elegans* as a Model to Assess the Potential Risk to Human Health Associated with the Use of Bisphenol A and Its Substitutes. *International Journal of Molecular Sciences*. 26(5), 2013. DOI: 10.3390/ijms26052013.
 110. KIM, S.W., MOON, J. a AN, Y.J., 2018. Matricidal Hatching Can Induce Multi-Generational Effects in Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 36394–36402 (2018). DOI: 10.1007/s11356-018-3535-4.
 111. KLAIC, M., BENCIC, I. a AHEL, M., 2022. 17 β -Ethinylestradiol (EE2): concentrations in the environment, effects and removal. *RSC Adv.* 12, 16035–16061 (2022). DOI: 10.1039/D2RA00915C.
 112. KOHRA, S. *et al.*, 2002. Effect of Bisphenol A on the Feeding Behavior of *Caenorhabditis Elegans*. *J. Health Sci.* 48, 93–95 (2002). DOI: 10.1248/jhs.48.93.
 113. KOPP, R., ZMORA, M. a BLUMBERG, B., 2017. Exposure to endocrine disrupting chemicals perturbs lipid metabolism and circadian rhythms. *J. Environ. Sci.* 62, 133–137 (2017). DOI: 10.1016/j.jes.2017.10.013.

114. KUCHARÍKOVÁ, S., HOCKICKOVÁ, P., MELNIKOV, K., BÁRDYOVÁ, Z. a KAIGLOVÁ, A., 2023. The *Caenorhabditis elegans* cuticle plays an important role against toxicity to bisphenol A and bisphenol S. *Toxicol. Rep.* 10, 341–347 (2023). DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.02.013.
115. KUMAR, M., GOSWAMI, M., VERMA, R.K. a DWIVEDI, K., 2020. Environmental Endocrine-Disrupting Chemical Exposure: Role in Non-Communicable Diseases. *Front. Public Health* 8, 553850 (2020). DOI: 10.3389/fpubh.2020.553850.
116. KURŞUNOĞLU, N.E. a SARER YUREKLI, B.P., 2022. Endocrine disruptor chemicals as obesogen and diabetogen: Clinical and mechanistic evidence. *World J. Clin. Cases* 10, 11226–11239 (2022). DOI: 10.12998/wjcc.v10.i31.11226.
117. LA MERRILL, M.A. *et al.*, 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 45–57 (2020). DOI: 10.1038/s41574-019-0273-8.
118. LEE, R.C., FEINBAUM, R.L. a AMBROS, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854 (1993). DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
119. LEE, H.J., CHATTOPADHYAY, S., GONG, E.Y., AHN, R.S. a LEE, K., 2003. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol. Sci.* 75, 40–46 (2003). DOI: 10.1093/toxsci/kfg150.
120. LEE, A., LE, H.M. a T. S., A., 2022. Endocrine disruptors on and in fruits and vegetables: Estimation of the potential exposure of the French population. *Food Chem.* 373, 131513 (2022). DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131513.
121. LEGIFRANCE — RÉPUBLIQUE FRANÇAISE, 2012. Loi n° 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A. *Journal officiel* 300 (2012). [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000026830015>
122. LEHMLER, H.J. *et al.*, 2018. Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. adults and children: NHANES 2013–2014. *ACS Omega* 3, 6523–6532 (2018). DOI: 10.1021/acsomega.8b00824.
123. LI, Y. *et al.*, 2013. Correlation of Chemical Acute Toxicity between the Nematode and the Rodent. *Toxicol Res (Camb)*. roč. 2, s. 403–412. DOI: 10.1039/C3TX50039J.
124. LIANG, F., HUO, X., WANG, W., LI, Y., ZHANG, J., FENG, Y. a WANG, Y., 2020. Association of bisphenol A or bisphenol S exposure with oxidative stress and immune disturbance among unexplained recurrent spontaneous abortion women. *Chemosphere.* 257 (2020), s. 127035. DOI 10.1016/j.chemosphere.2020.127035.
125. LIN, Y., CHEN, W., BIAN, J., XIAO, Q., LU, B., GE, Y., FU, B., SHAN, C., CHEN, T. a LU, S., 2025. Comparison of bisphenols in human urine, whole blood, serum and plasma: levels, optimal matrix identification and health risk. *J. Environ. Expo. Assess.* 4, 35 (2025). DOI: 10.20517/jeea.2025.49.
126. LIND, T., DUNDER, L., LEJONKLOU, M.H. *et al.*, 2025. Developmental low-dose bisphenol A exposure leads to extensive transcriptome female masculinization and male feminization later in life. *Commun. Med.* 5, 410 (2025). DOI: 10.1038/s43856-025-01119-8.
127. LIU, X., SAKAI, H., NISHIGORI, M., SUYAMA, K., NAWAJI, T., IKEDA, S., NISHIGOUCHI, M., OKADA, H., MATSUSHIMA, A., NOSE, T., SHIMOHIGASHI, M. a SHIMOHIGASHI, Y., 2019. Receptor-binding affinities of bisphenol A and its next-generation analogs for human nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 377, 114610 (2019). DOI: 10.1016/j.taap.2019.114610.
128. LIU, F. *et al.*, 2020a. Toxicological Assessment and Underlying Mechanisms of Tetrabromo-

- bisphenol A Exposure on the Soil Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Chemosphere* 242, 125078 (2020). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125078.
129. LIU, F. *et al.*, 2020b. Trans-Generational Effect of Neurotoxicity and Related Stress Response in *Caenorhabditis Elegans* exposed to Tetrabromobisphenol A. *Sci. Total Environ.* 703, 134920 (2020). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134920.
 130. LIU, Y. *et al.*, 2022. Oxidative Stress, Intestinal Damage, and Cell Apoptosis: Toxicity Induced by Fluopyram in *Caenorhabditis Elegans*. *Chemosphere* 286, 131830 (2022). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131830.
 131. LIU, D., XU, B.P. a AN, C.S., 2023a. Effects of Endocrine-Disrupting Heavy Metals on Human Health. *Toxics* 11, 322 (2023). DOI: 10.3390/toxics11040322.
 132. LIU, F., CAO, X., TIAN, F., JIANG, J., LIN, K., CHENG, J. a HU, X., 2023b. Continuous and Discontinuous Multi-Generational Disturbances of Tetrabromobisphenol A on Longevity in *Caenorhabditis Elegans*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 251, 114522 (2023). DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.114522.
 133. LUO, H., YING, M., YANG, Y., HUO, Q., HONG, X., TAO, G. a XIAO, P., 2025. Bisphenol AF Induced Neurodevelopmental Toxicity of Human Neural Progenitor Cells via Nrf2/HO-1 Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 26 (2025), s. 5685. DOI 10.3390/ijms26125685
 134. LÜ, L., LIU, Y., YANG, Y., HE, J., LUO, L., CHEN, S. a XING, H., 2024. Bisphenol A Exposure Interferes with Reproductive Hormones and Decreases Sperm Counts: A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Toxics*. 12(4), 294 (2024). DOI: 10.3390/toxics12040294.
 135. MANGELSDORF, David J., THUMMEL, C., BEATO, M., HERRLICH, P., SCHÜTZ, G., UMESONO, K., BLUMBERG, B., KASTNER, P., MARK, M., CHAMBON, P. a EVANS, R. M., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83 (1995), 6, s. 835–839. DOI 10.1016/0092-8674(95)90199-x.
 136. MARGIE, O., C. PALMER a I. CHIN-SANG, 2013. *C. Elegans* Chemotaxis Assay. *Journal of Visualized Experiments*. (71), e50069. DOI 10.3791/50069.
 137. MARTÍNEZ, M.Á., BLANCO, J., ROVIRA, J., KUMAR, V., DOMINGO, J.L. a SCHUHMACHER, M., 2020. Bisphenol A analogues (BPS and BPF) present a greater obesogenic capacity in 3T3-L1 cell line. *Food Chem. Toxicol.* 140, 111298 (2020). DOI: 10.1016/j.fct.2020.111298.
 138. MATSUSHIMA, A., OKADA, H., LIU, X., SHIMOHIGASHI, M. a SHIMOHIGASHI, Y., 2010. Bisphenol af is a full agonist for the estrogen receptor ERa but a highly specific antagonist for ERb. *Environmental Health Perspectives*. 118(9), 1267-1272 (2010). DOI: 10.1289/ehp.0901819
 139. MARX, J. (2002). Nobel Prize in Physiology or Medicine. Tiny worm takes a star turn. *Science*, roč. 298, č. 5593, s. 526. DOI: 10.1126/science.298.5593.526.
 140. MATHEW, M. D., N. D. MATHEW a P. R. EBERT, 2012. WormScan: A Technique for High-Throughput Phenotypic Analysis of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*. 7(3), e33483. DOI: 10.1371/journal.pone.0033483.
 141. MAXWELL, C.K., LEUNG, P.L., WILLIAMS, A., BENEDETTO, C., AU, K.J., HELMCKE, M. a ASCHNER, J.N., MEYER, 2008. *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. *Toxicol. Sci.* 106(1), 5–28 (2008). DOI: 10.1093/toxsci/kfn121.
 142. MCDONOUGH, C. M., D. J. GUO a T. L. GUO, 2021. Developmental Toxicity of Bisphenol S in *Caenorhabditis Elegans* and NODEF Mice. *Neurotoxicology*. 87, 156–166. DOI: 10.1016/j.neuro.2021.09.006.
 143. MELNIKOV, K., KUCHARÍKOVÁ, S., BÁRDYOVÁ, Z., BOTEK, N., KAIGLOVÁ, A., 2023. Applications of a Powerful Model Organism *Caenorhabditis Elegans* to Study the

- Neurotoxicity Induced by Heavy Metals and Pesticides. *Physiol. Res.* 72, 149–166 (2023). DOI: 10.33549/physiolres.934977.
144. MERCOGLIANO, R. a SANTONICOLA, S., 2018. Investigation on bisphenol A levels in human milk and dairy supply chain: A review. *Food Chem. Toxicol.* 114, 98–107 (2018). DOI: 10.1016/j.fct.2018.02.021 .
145. MERROW, M. a OLMEDO, M., 2014. In situ Chemotaxis Assay in *Caenorhabditis elegans* (for the Study of Circadian Rhythms). *Bio-Protocol* 4, e1040 (2014). DOI: 10.21769/Bio-Protoc.1040.
146. MERSHA, M.D., PATEL, B.M., PATEL, D., RICHARDSON, B.N. a DHILLON, H.S., 2015. Effects of BPA and BPS exposure limited to early embryogenesis persist to impair non-associative learning in adults. *Behav. Brain Funct.* 11(1), 1–5 (2015). DOI: 10.1186/\$12993-015-0071-y.
147. MERSHA, M.D., SANCHEZ, K.R., TEMBURNI, M.K. a DHILLON, H.S. (2018). Long-term Behavioral and Reproductive Consequences of Embryonic Exposure to Low-dose Toxicants. *J. Vis. Exp.*, roč. 133, e56771. DOI: 10.3791/56771.
148. MIELKE, H., PARTOSCH, F. a GUNDERT-REMY, U., 2011. The contribution of dermal exposure to the internal exposure of bisphenol A in man. *Toxicol. Lett.* 204, 190–198 (2011). DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.04.032.
149. MIMOTO, M.S., NADAL, A. a SARGIS, R.M., 2017. Polluted pathways: mechanisms of metabolic disruption by endocrine disrupting chemicals. *Curr. Environ. Health Rep.* 4, 208–222 (2017). DOI: 10.1007/s40572-017-0137-0.
150. MISHRA, S. *et al.*, 2023. Specific Sensory Neurons and Insulin-like Peptides Modulate Food Type-Dependent Oogenesis and Fertilization in *Caenorhabditis Elegans*. *eLife* 12, e83224 (2023). DOI: 10.7554/eLife.83224.
151. MNIF, W., HASSAIRA, S., MOALLA, F., BOUSEJRA, N., BOUAZIZ, F. a ZOUARI, N., 2011. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 2265–2303 (2011). DOI: 10.3390/ijerph8062265.
152. MOKRA, K., WOŹNIAK, K., BUKOWSKA, B., SICIŃSKA, P. a MICHAŁOWICZ, J., 2018. Low-concentration exposure to BPA, BPF and BPAF induces oxidative DNA bases lesions in human peripheral blood mononuclear cells. *Chemosphere* 201, 119–126 (2018). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.02.166.
153. MOON, M.K., 2019. Concern about the Safety of Bisphenol A Substitutes. *Diabetes Metab. J.* 43, 46–57 (2019). DOI: 10.4093/dmj.2019.0027.
154. MOREMAN, J., LEE, O., TRZNADEL, M., DAVID, A., KUDOH, T. a TYLER, C.R., 2017. Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish Embryo-Larvae. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12796–12805 (2017). DOI: 10.1021/acs.est.7b03283.
155. MORENO-ARRIOLA, E., CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N., COBALLASE-URRUTIA, E., PEDRAZA-CHAVERRI, J., CARMONA-APARICIO, L. a ORTEGA-CUELLAR, D., 2014. *Caenorhabditis elegans*: A useful model for studying metabolic disorders in which oxidative stress is a contributing factor. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 705253 (2014). DOI: 10.1155/2014/705253.
156. MORIYAMA, K., TAGAMI, T., AKAMIZU, T., USUI, T., SAIJO, M., KANAMOTO, N., NAKAO, K., 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (11), s. 5185–5190. DOI 10.1210/jc.2002-020209.
157. MOYA, A., TEJEDOR, D., MANETTI, M., CLAVIJO, A., PAGANO, E., MUNARRIZ, E. a KRONBERG, M.F., 2022. Reproductive toxicity by exposure to low concentrations of pesticides in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* 475, 153229 (2022). DOI: 10.1016/j.tox.2022.153229.

158. MU, X. *et al.*, 2022. Bisphenol F Impaired Zebrafish Cognitive Ability through Inducing Neural Cell Heterogeneous Responses. *Environ. Sci. Technol.* 56, 8528–8540 (2022). DOI: 10.1021/acs.est.2c01531.
159. NADAL, M. a DOMINGO, J.L., 2013. Sources of Human Exposure. In: CARPENTER, D.O. (ed.). *Effects of Persistent and Bioactive Organic Pollutants on Human Health*. Wiley, 8–25 (2013). DOI: 10.1002/9781118679654.ch2.
160. NAGAR, Y., THAKUR, R.S., PARVEEN, T., PATEL, D.K., RAM, K.R. a SATISH, A., 2020. Toxicity assessment of parabens in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* 246, 125730 (2020). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125730.
161. NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2022. NTP developmental and reproductive toxicity technical report on the modified one-generation study of bisphenol AF (CASRN 1478-61-1). Research Triangle Park (NC): National Toxicology Program (2022). Dostupné na: <https://ntp.niehs.nih.gov>
162. NEVORAL *et al.*, 2018. Long-term exposure to very low doses of bisphenol S affects female reproduction. *Reproduction* 156, 47–57 (2018). DOI: 10.1530/REP-18-0092.
163. NORDKAP, L., JENSEN, M. a LEFFERS, H., 2012. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: Semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355, 221–230 (2012). DOI: 10.1016/j.mce.2011.05.048.
164. NOURIAN, A. *et al.*, 2020. Bisphenol-A analogue (bisphenol-S) exposure alters female reproductive tract and apoptosis/oxidative gene expression in blastocyst-derived cells. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 23, 601–613 (2020). DOI: 10.22038/ijbms.2020.40893.9664.
165. ODETAYO, A.F. a OLAYAKI, L.A., 2022. Effect of bisphenol F on sexual performance and quality of offspring in male Wistar rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 244, 114079 (2022). DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.114079.
166. OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION, 2024. L 3190, 31. 12. 2024. Luxembourg: Publications Office of the European Union (2024). Dostupné na: <https://eur-lex.europa.eu>
167. OKADA, H., TOKUNAGA, T., LIU, X., TAKAYANAGI, S., MATSUSHIMA, A. a SHIMOHIGASHI, Y., 2008. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor gamma. *Environ. Health Perspect.* 116, 32–38 (2008). DOI: 10.1289/ehp.10587.
168. PAN, Y. *et al.*, 2020. Occurrence and maternal transfer of multiple bisphenols in the human maternal–fetal–placental unit. *Environ. Sci. Technol.* 54, 3476–3486 (2020). DOI: 10.1021/acs.est.0c00206.
169. PARK, H.E.H., JUNG, Y. a LEE, S.J.V., 2017. Survival Assays Using *Caenorhabditis Elegans*. *Mol. Cells* 40, 90–99 (2017). DOI: 10.14348/molcells.2017.0017.
170. PENG, H. *et al.*, 2008. Straightening *Caenorhabditis elegans* images. *Bioinformatics* 24, 234–242 (2008). DOI: 10.1093/bioinformatics/btm569.
171. PERELLO, G., GOMEZ-CATALAN, J., CASTELL, V., LLOBET, J.M. a DOMINGO, J.L., 2012. Assessment of the temporal trend of the dietary exposure to PCDD/Fs and PCBs in Catalonia, over Spain: health risks. *Food Chem. Toxicol.* 50, 399–408 (2012). DOI: 10.1016/j.fct.2011.06.077.
172. PETRATOU, D. *et al.*, 2023. Assessing Locomotory Rate in Response to Food for the Identification of Neuronal and Muscular Defects in *C. Elegans*. *STAR Protoc.* 5, 102801 (2023). DOI: 10.1016/j.xpro.2023.102801.
173. PORTA-DE-LA-RIVA, M., FONTRODONA, L., VILLANUEVA, A. a CERÓN, J., 2012. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *J. Vis. Exp.* 69, e4019 (2012). DOI: 10.3791/4019.

174. POTIRIS, A., CHRYSICOU, R.S. a DEGEORGES, K.G., 2025. Prenatal Dietary Exposure to Endocrine Disruptors and Its Lasting Impact on Offspring Health. *Toxics* 13, 864 (2025). DOI: 10.3390/toxics13100864.
175. PUBCHEM, 2025. Bisphenol AF. [online]. National Center for Biotechnology Information (2025). Dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73864>
176. QU, M., QIU, Y., KONG, Y. a WANG, D., 2019. Amino Modification Enhances Reproductive Toxicity of Nanopolystyrene on Gonad Development and Reproductive Capacity in Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Environ. Pollut.* 254, 112978 (2019). DOI: 10.1016/j.envpol.2019.112978.
177. RAMÍREZ, V., MERKEL, S., TIETZ, T. a RIVAS, A., 2023. Risk assessment of food contact materials [JB]. *EFSA J.*, 21(EU-FORA Series 6). DOI: 10.2903/j.efsa.2023.e211015.
178. REININGER, N. a OEHLMANN, J., 2024. Regrettable substitution? Comparative study of the effect profile of bisphenol A and eleven analogues in an in vitro test battery. *Environ. Sci. Eur.* 36, 76 (2024). DOI: 10.1186/s12302-024-00900-1.
179. ROBERTS, A.H., BOWEN, J.E., ZHOU, X., BURKE, I., WENAAS, M.H., BLAKE, T.A., TIMMONS, S.C. a KUZMANOV, A., 2022. Synthesis and Reproductive Toxicity of Bisphenol A Analogs with Cyclic Side Chains in *Caenorhabditis Elegans*. *Toxicol. Ind. Health* 38, 665–674 (2022). DOI: 10.1177/07482337221117357.
180. RODRIGUES, D.T., PADILHA, H.A., SOARES, A.T.G., DE SOUZA, M.E.O., GUERRA, M.T. a ÁVILA, D.S., 2024. The *Caenorhabditis elegans* neuroendocrine system and their modulators: An overview. *Mol. Cell. Endocrinol.* 586, 112191 (2024). DOI: 10.1016/j.mce.2024.112191.
181. ROCHESTER, J.R. a BOLDEN, A.L., 2015. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ. Health Perspect.* 123, 643–650 (2015). DOI: 10.1289/ehp.1408989.
182. SALEH, A.C. *et al.*, 2021. BPA and BPS affect the expression of anti-Mullerian hormone (AMH) and its receptor during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 19, 119 (2021). DOI: 10.1186/s12958-021-00773-6.
183. SANTORO, A. *et al.*, 2019. Neuro-toxic and reproductive effects of BPA. *Current Neuropharmacology*, 17(12), s. 1109–1132. DOI: 10.2174/1570159X17666190726112101
184. SCSUKOVA, S., ROLLEROVA, E. a BUJNAKOVA MLYNARCIKOVA, A., 2016. Impact of endocrine disrupting chemicals on onset and development of female reproductive disorders and hormone-related cancer. *Reprod. Biol.* 16, 243–254 (2016). DOI: 10.1016/j.repbio.2016.09.001
185. SHAFEI, A., RAMZY, M.M., HEGAZY, A.I., HUSSENY, A.K., EL-HADARY, U.G. a TAHA, M.M., 2018. The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. *Gene*. 647 (2018), s. 235–243. DOI 10.1016/j.gene.2018.01.016.
186. SHAMHARI, A., ABD HAMID, Z., BUDIN, S.B., SHAMSUDIN, N.J. a TAIB, I.S., 2021. Bisphenol A and Its Analogues Deteriorate the Hormones Physiological Function of the Male Reproductive System: A Mini-Review. *Biomedicines*. 9(11), 1744 (2021). DOI: 10.3390/biomedicines9111744.
187. SHAO, Y. *et al.*, 2021. Evidence of increased estrogenicity upon metabolism of Bisphenol F – Elucidation of the key metabolites. *Sci. Total Environ.* 787, 147669 (2021). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.147669.
188. SHARMA, A., KULSHRESHTHA, A., BHARDWAJ, A. a SHARMA, P.K., 2020. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reprod. Med. Biol.* 19, 243–253 (2020). DOI: 10.1002/rmb2.12326.
189. SGS SOCIÉTÉ GÉNÉRALE DE SURVEILLANCE SA. EU issues guideline for BPA and

- other hazardous bisphenols in food contact materials [online]. Baar: SGS, 13. 1. 2026 [cit. [cit. 3.1.2026]. Dostupné z: <https://www.sgs.com/en-pa/news/2026/01/safeguards-00226-eu-issues-guideline-for-bpa-and-other-hazardous-bisphenols-in-food-contact-materials>
190. SHI, Y., FENG, X. a CHUNG, C.Y., 2025. Chronic adulthood exposure to bisphenol A causes behavioral changes via suppressing dopamine transporter trafficking. *Sci. Rep.* 15, 13520 (2025). DOI: 10.1038/s41598-025-98084-y.
 191. SHIN, N., CUENCA, L., KARTHIKRAJ, R., KANNAN, K. a COLAIÁCOVO, M.P., 2019. Assessing Effects of Germline Exposure to Environmental Toxicants by High-Throughput Screening in *C. Elegans*. *PLoS Genetics* 15, e1007975 (2019). DOI: 10.1371/journal.pgen.1007975.
 192. SIFAKIS, S., ANDROUTSOPOULOS, V.P., TSATSAKIS, A.M. a SPANDIDOS, D.A., 2017. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 51, 56–70 (2017). DOI: 10.1016/j.etap.2017.02.024.
 193. SKAKKEBAEK, N.E., 2016. A brief review of the link between environment and male reproductive health: lessons from studies of testicular germ cell cancer. *Horm. Res. Paediatr.* 86, 240–246 (2016). DOI: 10.1159/000443400.
 194. SREBNY, V. *et al.*, 2025. Beyond Estrogenicity: A Comparative Assessment of Bisphenol A and Its Alternatives in In Vitro Assays Questions Safety of Replacements. *Environ. Sci. Technol.* 59, 17457–17470 (2025). DOI: 10.1021/acs.est.5c07018.
 195. SULSTON, J.E. a HORVITZ, H.R., 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56, 110–156 (1977). DOI: 10.1016/0012-1606(77)90158-0.
 196. SULSTON, J.E., SCHIERENBERG, E., WHITE, J.G. a THOMSON, J.N., 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100, 64–119 (1983). DOI: 10.1016/0012-1606(83)90201-4.
 197. SUN, Q., CORNELIS, M.C. a LILLY, M.S., 2014. Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: a prospective investigation in the Nurses' Health Study (NHS) and NHSII cohorts. *Environ. Health Perspect.* 122, 616–623 (2014). DOI: 10.1289/ehp.1307201
 198. SUN, J. *et al.*, 2024. Urinary profiles of bisphenol S derivatives and their exposure pathway analysis in maternal and infant populations of Beijing. *Environ. Int.* 194, 109169 (2024). DOI: 10.1016/j.envint.2024.109169.
 199. SWEDISH CHEMICALS AGENCY (KEMI). Usage of two-component epoxy in relining. b.r. (bez dátumu). [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: <https://www.kemi.se/en/rules-and-regulations/rules-applicable-in-sweden-only/certain-swedish-restrictions-and-bans/usage-of-two-component-epoxy-in-relining>
 200. TAN, L., WANG, S., WANG, Y., HE, M. a LIU, D., 2015. Bisphenol A Exposure Accelerated the Aging Process in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Toxicol. Lett.* 235, 75–83 (2015). DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.03.010.
 201. TARAFDAR, A., SIROHI, R., BALAKUMARAN, P.A., RESHMY, R., MADHAVAN, A., SINDHU, R., BINOD, P., KUMAR, Y., KUMAR, D. a SIM, S.J., 2022. The hazardous threat of Bisphenol A: Toxicity, detection and remediation. *J. Hazard. Mater.* 423, 127097 (2022). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127097.
 202. TEJEDA-BENITEZ, L. a OLIVERO-VERBEL, J., 2016. *Caenorhabditis Elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 237, 1–35 (2016). DOI: 10.1007/978-3-319-23573-8_1.
 203. THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM, 1998. Genome Sequence of the Nematode *C. Elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 282, 1012–1018 (1998).

- DOI: 10.1126/science.282.5396.2012.
204. THOENE, M., DZIK, E., KONOPKA, G. a KAMIŃSKI, M.W., 2020. Bisphenol S in food causes hormonal and obesogenic effects comparable to or worse than bisphenol A: a literature review. *Nutrients*. 12(2), 532 (2020). DOI: 10.3390/nu12020532.
 205. THOMPSON, R.F. a SPENCER, W.A., 1966. Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol. Rev.* 73, 16–43 (1966). DOI: 10.1037/h0022681
 206. TIMMONS, L., COURT, D. L. a FIRE, A., 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 263 (1-2), 103–112 (2001). DOI: 10.1016/S0378-1119(00)00579-5
 207. TIWARI, S. K., S. AGARWAL, L. K. CHAUHAN, V. N. MISHRA a R. K. CHATURVEDI, 2015. Bisphenol-A impairs myelination potential during development in the hippocampus of the rat brain. *Molecular Neurobiology*. 51(3), 1395–1416. ISSN 1559-1182. DOI 10.1007/s12035-014-8817-3.
 208. TOFT, G., 2023. Epidemiological studies on the effects of prenatal exposure to endocrine-disrupting compounds on fertility. In: *Environmental Contaminants and Endocrine Health*. Academic Press, pp. 227–232 (2023). DOI: 10.1016/B978-0-12-824464-7.00008-8.
 209. TORRES-GARCÍA, J.L., AHUACTZIN-PÉREZ, M., FERNÁNDEZ, F.J. a CORTÉS-ESPINOSA, D.V., 2022. Bisphenol A in the environment and recent advances in biodegradation by fungi. *Chemosphere*. 303(1), 134940 (2022). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.134940.
 210. TOURNAIRE, M., CATTAN, P.N. a NIVEAU, M.G., 2016. Adverse health effects in children of women exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Thérapie* 71, 395–404 (2016). DOI: 10.1016/j.therap.2016.01.006.
 211. U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), 1998. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report. Washington, D.C.: EPA (1998). [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-and-testing-advisory-committee-edstac-final>
 212. ULLAH, A. *et al.*, 2018. Impact of low-dose chronic exposure to bisphenol A and its analogue bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: A focus on the possible hormonal mode of action. *Food Chem. Toxicol.* 121, 24–36 (2018). DOI: 10.1016/j.fct.2018.08.024.
 213. ULLAH, H. *et al.*, 2021. Chronic exposure of bisphenol S (BPS) affect hypothalamic-pituitary-testicular activities in adult male rats: possible in estrogenic mode of action. *Environ. Health Prev. Med.* 26, 31 (2021). DOI: 10.1186/s12199-021-00954-0.
 214. VAHEDI, M., SAEEDI, A., POORBAGHI, S.L., SEPEHRIMANESH, M. a FATTAHI, M., 2016. Metabolic and endocrine effects of bisphenol A exposure in market seller women with polycystic ovary syndrome. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 23546–23550 (2016). DOI: 10.1007/s11356-016-7573-5.
 215. VANDENBERG, L.N. *et al.*, 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455 (2012). DOI: 10.1210/er.2011-1050.
 216. VASILJEVIC, T. a HARNER, T., 2021. Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: properties, sources and global levels. *Sci. Total Environ.* 789, 148013 (2021). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.148013.
 217. VEJDOVSZKY, K., MIADOKOVA, C. a RICE, B.C.P., 2017. Combinatory estrogenic effects between the isoflavone genistein and the mycotoxins zearalenone and alternariol in vitro. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1600714 (2017). DOI: 10.1002/mnfr.201600526.
 218. vom SAAL *et al.*, 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current le-

- vels of exposure. *Reprod. Toxicol.*, 24(2), pp. 131–138. DOI: 10.1016/j.reprotox.2007.07.005
219. WADE, M., DELAWDER, V., RENEAU, P. a DOS SANTOS, J.M., 2020. The effect of BPA exposure on insulin resistance and type 2 diabetes – the impact of muscle contraction. *Med. Hypotheses*. 140 (2020), s. 109675. DOI 10.1016/j.mehy.2020.109675.
 220. WANG, D. a X. XING, 2008. Assessment of Locomotion Behavioral Defects Induced by Acute Toxicity from Heavy Metal Exposure in Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Journal of Environmental Sciences*. 20(9), 1132–1137. DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62160-9.
 221. WANG, D., WANG, Y. a SHEN, L., 2010. Confirmation of Combinational Effects of Calcium with Other Metals on Nematode Lifespan. *J. Environ. Sci.* 22, 731–737 (2010). DOI: 10.1016/S1001-0742(09)60170-4.
 222. WANG, M. *et al.*, 2019a. A Vault-Encapsulated Enzyme Approach for Efficient Degradation and Detoxification of Bisphenol A and Its Analogues. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7, 5808–5817 (2019). DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b05432.
 223. WANG, M. *et al.*, 2019b. Transgenerational Effects of Diesel Particulate Matter on *Caenorhabditis Elegans* through Maternal and Multigenerational Exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 635–643 (2019). DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.12.027.
 224. WANG, Y. a QIAN, H., 2021. Phthalates and Their Impacts on Human Health. *Healthcare (Basel)* 9, 603 (2021). DOI: 10.3390/healthcare9050603.
 225. WANG, Y. *et al.*, 2023. Neurotoxicity of bisphenol A exposure on *Caenorhabditis elegans* induced by disturbance of neurotransmitter and oxidative damage. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 252, 114617 (2023). DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.114617.
 226. WESCOTT, S. A., E. A. RONAN a X. Z. XU, 2016. Insulin signaling genes modulate nicotine-induced behavioral responses in *Caenorhabditis elegans*. *Behavioural Pharmacology*. 27(1), 44–49. ISSN 0955-8810. DOI 10.1097/FBP.0000000000000186.
 227. WESCHLER, C.J. a NAZAROFF, W.W., 2014. Dermal uptake of organic vapors commonly found in indoor air. *Environ. Sci. Technol.*, 48(2), pp. 1230–1237. DOI: 10.1021/es405490a.
 228. WHANGBO, J. a C. P. HUNTER, 2008. Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*. 24(6), 297–305. ISSN 0168-9525. DOI 10.1016/j.tig.2008.03.007.
 229. WHITE, J.G. *et al.*, 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 314, 1–340 (1986). DOI: 10.1098/rstb.1986.0056.
 230. WHO/IPCS, 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva: World Health Organization (2002). WHO/PCS/EDC/02.2. [cit. 3.1.2026]. Dostupné na: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-PSC-EDC-02.2>
 231. WIKLUND, L. a BERONIUS, A., 2022. Systematic evaluation of the evidence for identification of endocrine disrupting properties of Bisphenol F. *Toxicology* 476, 153255 (2022). DOI: 10.1016/j.tox.2022.153255.
 232. WILLIAMS, D.C., BAILEY, D.C. a FITSANAKIS, V.A., 2017. *Caenorhabditis Elegans* as a Model to Assess Reproductive and Developmental Toxicity. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*. Academic Press, s. 303–314 (2017). DOI: 10.1016/B978-0-12-804239-7.00017-2.
 233. WILSON, N.K. *et al.*, 2007. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ. Res.* 103, 9–20 (2007). DOI: 10.1016/j.envres.2006.04.006.
 234. WU, L.H. *et al.*, 2018. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *Sci. Total Environ.* 615, 87–98 (2018). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.194.
 235. XIANG, J., SUN, L.R. a LIU, W.D., 2023. The obesogenic side of Genistein. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 14, 1308341 (2023). DOI: 10.3389/fendo.2023.1308341.

236. XIAO, X. *et al.*, 2019. Toxicity and multigenerational effects of bisphenol S exposure to: *Caenorhabditis elegans* on developmental, biochemical, reproductive and oxidative stress. *Toxicol. Res.* 8, 630–640 (2019). DOI: 10.1039/c9tx00055k.
237. XU, H., HUANG, K.F. a SUN, W.H., 2008. Exposure to 17 alpha-ethinylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 88, 1–8 (2008). DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.01.020.
238. XU, Y. *et al.*, 2024. Effects and mechanisms of bisphenols exposure on neurodegenerative diseases risk: A systemic review. *Sci. Total Environ.* 919, 170670 (2024). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.170670.
239. YANG, Y. *et al.*, 2024. Environmentally Relevant Exposure to Tetrabromobisphenol A Induces Reproductive Toxicity via Regulating Glucose-6-Phosphate 1-Dehydrogenase and Sperm Activation in *Caenorhabditis Elegans*. *Sci. Total Environ.* 907, 167820 (2024). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.167820.
240. YANG, Z., ZHANG, J., WANG, M., WANG, X., LIU, H., ZHANG, F. a FAN, H., 2024. Prenatal endocrine-disrupting chemicals exposure and impact on offspring neurodevelopment: A systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology* 103, 335–357 (2024). DOI: 10.1016/j.neuro.2024.07.006
241. YILMAZ, B., GEDIK, Z.Z. a BELL, D.S., 2020. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 21, 127–147 (2020). DOI: 10.1007/s11154-019-09521-z.
242. YING, S.Y. a LIN, S.L., 2005. Intronic microRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 515–520 (2005). DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.062.
243. YU, Y., CHEN, H., HUA, X., DANG, Y., HAN, Y., YU, Z., CHEN, X., DING, P. a LI, H., 2020. Polystyrene Microplastics (PS-MPs) Toxicity Induced Oxidative Stress and Intestinal Injury in Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Sci. Total Environ.* 726, 138679 (2020). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.13867
244. YU, Y., HUA, X., CHEN, H., YANG, Y., DANG, Y. a XIANG, M., 2022. Tetrachlorobisphenol A mediates reproductive toxicity in *Caenorhabditis elegans* via DNA damage-induced apoptosis. *Chemosphere* 300, 134588 (2022). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.134588
245. YU, Y., TAN, S., GUO, H., HUA, X., CHEN, H., YANG, Y., XIE, D., YI, C., LING, H. a XIANG, M., 2024. Chronic neurotoxicity of Tetrabromobisphenol A: Induction of oxidative stress and damage to neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* 350, 141142 (2024). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2024.141142.
246. ZALKO, D. *et al.*, 2011. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82, 424–430 (2011). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.058.
247. ZEČIĆ, A. a BRAECKMAN, B.P., 2020. DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis Elegans* and Its Role in Metabolic Remodeling. *Cells* 9, 109 (2020). DOI: 10.3390/cells9010109.
248. ZHANG, Y.F., REN, X.M., LI, Y.Y., YAO, X.F., LI, C.H., QIN, Z.F. a GUO, L.H., 2018. Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere with thyroid hormone signaling pathway in vitro and in vivo. *Environ. Pollut.* 237, 1072–1079 (2018). DOI: 10.1016/j.envpol.2017.11.027
249. ZHANG, H. *et al.*, 2020. Occurrence of bisphenol A and its alternatives in paired urine and indoor dust from Chinese university students. *Chemosphere* 247, 125987 (2020). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.125987.
250. ZHANG, H., S. GAO a W. CHEN, 2022. Automated Recognition and Analysis of Head Thrashes Behavior in *C. Elegans*. *BMC Bioinformatics.* 23(1), 87. ISSN 1471-2105. DOI 10.1186/S12859-022-04622-0.
251. ZHANG, X., ZHANG, X., ZHANG, Z., SHI, Y., WANG, J., RU, S. a TIAN, H., 2024. Bisphenol S causes excessive estrogen synthesis by activating FSHR and the downstream cAMP/

- PKA signaling pathway. *Commun. Biol.* 7, 125987 (2024). DOI: 10.1038/s42003-024-06449-2.
252. ZHANG, J., YU, X., LI, W., JIANG, Y., ZHANG, L. a WANG, S., 2025. Bisphenol S impairs oocyte quality by inducing gut microbiota dysbiosis. *mSystems* 10, e00912-24 (2025). DOI: 10.1128/msystems.00912-24.
 253. ZHAO, K., ZHANG, Y., LIU, M., HUANG, Y., WANG, S., AN, J., WANG, Y. a SHANG, Y., 2023. The joint effects of nanoplastics and TBBPA on neurodevelopmental toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Res.* 12, 76–85 (2023). DOI: 10.1093/toxres/tfac086.
 254. ZHAO, Y., CHEN, J., WANG, R., PU, X. a WANG, D., 2022. A review of transgenerational and multigenerational toxicology in the in vivo model animal *Caenorhabditis elegans*. *J. Appl. Toxicol.* 42, 1721–1740 (2022). DOI: 10.1002/jat.4360
 255. ZHENG, F., CHEN, C. a ASCHNER, M., 2022. Neurotoxicity Evaluation of Nanomaterials Using *C. Elegans*. *Curr. Protoc.* 2, e496 (2022). DOI: 10.1002/cpz1.496.
 256. ZHOU, D., YANG, J., LI, H., CUI, C., YU, Y., LIU, Y. a LIN, K., 2016. The chronic toxicity of bisphenol A to *Caenorhabditis elegans* after long-term exposure at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere* 154, 546–551 (2016). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.011.
 257. ZHOU, D., 2018. Ecotoxicity of Bisphenol S to *Caenorhabditis Elegans* by Prolonged Exposure in Comparison with Bisphenol A. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 2560–2565 (2018). DOI: 10.1002/etc.4214.
 258. ZHUANG, Z., ZHAO, Y., WU, Q., LI, M., LIU, H., SUN, L., GAO, W. a WANG, D., 2014. Adverse Effects from Clenbuterol and Ractopamine on Nematode *Caenorhabditis elegans* and the Underlying Mechanism. *PLoS One* 9, e85482 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0085482.
 259. ZOELLER, R.T., BROWN, T.R., DOAN, L.L., GORE, A.C., SKAKKEBAEK, N.E., SOTO, A.M., WOODRUFF, T.J. a VOM SAAL, F.S., 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153, 4097–4110 (2012). DOI: 10.1210/en.2012-1422.
 260. ŽALMANOVÁ, T., HOŠKOVÁ, K., NEVORAL, J., ADÁMKOVÁ, K., KOTT, T., ŠULC, M., KOTÍKOVÁ, Z., PROKEŠOVÁ, Š., JÍLEK, F., KRÁLÍČKOVÁ, M. a PETR, J., 2017. Bisphenol S negatively affects the meiotic maturation of pig oocytes. *Sci. Rep.* 7, 485 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-00570-5.

ALŽBETA KAIGLOVÁ
PATRÍCIA HOCKICKOVÁ
SOŇA KUCHARÍKOVÁ

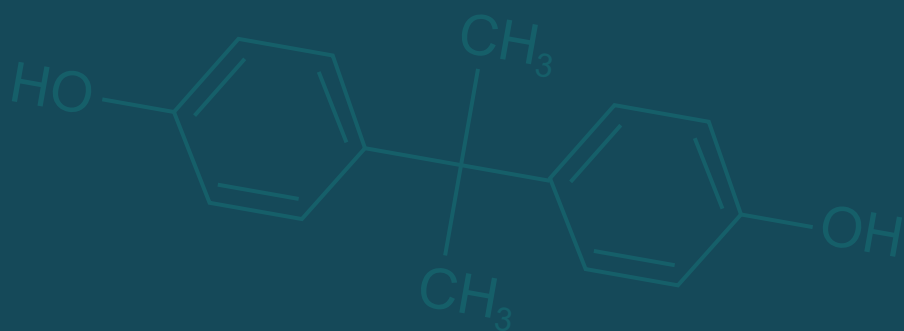
Modelový organizmus
Caenorhabditis elegans

ako nástroj na hodnotenie nežiaducich účinkov
endokrinných disruptorov –
bisfenolu A a jeho alternatív

Zodpovedný redaktor: PhDr. Pavol Kršák
Grafická úprava: Jana Janíková
Obálka: Mgr. Marek Petržalka

Pre Fakultu zdravotníctva a sociálnej práce Trnavskej univerzity v Trnave
vydalo vydavateľstvo Typi Universitatis Tyrnaviensis,
spoločné pracovisko Trnavskej univerzity
a VEDY, vydavateľstva Slovenskej akadémie vied, ako 457. publikáciu.
Vytlačila VEDA, vydavateľstvo SAV.

ISBN 978-80-568-0984-6 (print)
ISBN 978-80-568-0972-3 (online)
DOI: 10.31262/978-80-568-0972-3/2026



ISBN 978-80-568-0972-3

