

PAWEŁ STRUCIŃSKI, JAN K. LUDWICKI, KATARZYNA GÓRALCZYK, KATARZYNA CZAJA

## WYBRANE ASPEKTY DZIAŁANIA KSENOESTROGENÓW Z GRUPY PERSYSTENTNYCH ZWIĄZKÓW CHLOROORGANICZNYCH

### ENDOCRINE DISRUPTING ACTION OF PERSISTENT ORGANOCHLORINE COMPOUNDS – AN OVERVIEW

Zakład Toksykologii Środowiskowej  
Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24  
E-mail: pstrucinski@pzh.gov.pl  
Kierownik: prof. dr hab. Jan K. Ludwicki

*Na podstawie przeglądu piśmiennictwa przedstawiono zagadnienie obecności w środowisku trwałych (persystentnych) zanieczyszczeń mogących wywoływać niekorzystny wpływ na układ hormonalny człowieka. Omówiono działanie związków chloroorganicznych wykazujących zdolność do wywoływania odpowiedzi biologicznej zbliżonej do działania żeńskich hormonów płciowych (17 $\beta$ -estradiolu), tzw. ksenoestrogenów oraz mechanizmy prowadzące do nadmiernej proliferacji komórek m.in. gruczołu piersiowego i w konsekwencji zwiększonego prawdopodobieństwa powstania nowotworu złośliwego sutka u kobiet. Opisano badania zależności między stężeniem związków chloroorganicznych w osoczu i tkance tłuszczowej kobiet, a występowaniem nowotworu sutka.*

#### WSTĘP

Człowiek, niezależnie od wieku, miejsca zamieszkania czy charakteru wykonywanej pracy, jest narażony na działanie olbrzymiej, praktycznie niemożliwej do oszacowania, liczby związków chemicznych. Obecność substancji obcych w środowisku jest m.in. efektem rozwoju przemysłu i towarzyszących mu odpadów, ścieków i pyłów, a także szeroko pojętych procesów spalania oraz masowego stosowania środków ochrony roślin i nawozów sztucznych w rolnictwie. Wśród innych egzogennych czynników mogących wpływać na ogólny stan zdrowia człowieka należy również wymienić substancje dodatkowe do żywności, syntetyczne farmaceutyki, promieniowanie jonizujące i elektromagnetyczne, drgania czy hałas. Nie należy również zapominać o naturalnych związkach chemicznych spożywanych przez człowieka z pożywieniem, w tym naturalnych toksynach (np. mikotoksyny czy alkaloidy). Źródłem niewielkich ilości zanieczyszczeń środowiska są również zjawiska naturalne takie jak np.: pożary lasów czy erupcje wulkanów.

Szczególną grupą zanieczyszczeń środowiska, której w ostatnich latach poświęca się coraz więcej uwagi są tzw. persystentne zanieczyszczenia organiczne (ang.: *Persistent*

*Organic Pollutants*, POPs). Do grupy tej należy wiele związków chemicznych charakteryzujących się następującymi cechami [10, 62]:

- zdolnością do wywoływania efektów toksycznych,
- trwałością we wszystkich elementach środowiska (persystencją),
- zdolnością do biokumulacji,
- zdolnością do transportu atmosferycznego na duże odległości,
- zdolnością do wywoływania niekorzystnych skutków w środowisku i dla człowieka zarówno w pobliżu, jak i w dużej odległości od źródła zanieczyszczenia.

Tak więc, biorąc pod uwagę, że okres półtrwania niektórych związków z grupy POPs sięga nawet kilkudziesięciu lat, ich zdolność do transgranicznej, czy też lepiej, transkontynentalnej migracji do najodleglejszych zakątków kuli ziemskiej, a także uwzględniając, że człowiek stanowi ostatnie ogniwo łańcucha pokarmowego należy przyjąć, że narażenie na te związki będzie trwało przez kolejne dziesięciolecia stawiając przed toksykologią środowiskową wciąż nowe wyzwania.

Wśród związków spełniających kryteria przynależności do POPs, na pierwszy plan wysuwa się liczna, szacowana na kilkanaście tysięcy substancji, grupa persystentnych związków chloroorganicznych. Należą do niej powszechnie stosowane w przeszłości insektycydy chloroorganiczne: DDT (oraz jego izomery i metabolity), izomery heksachlorocykloheksanu (HCH), związki cyklodienowe (aldryna, dieldryna, endryna), heptachlor, metoksychlor, endosulfan, chlordan i pochodne, mireks, toksafen i wiele innych, oraz związki stosowane w przemyśle bądź powstające w sposób niezamierzony: heksachlorobenzen (HCB), polichlorowane bifenyly (PCB), polichlorowane naftaleny (PCN), polichlorowane dibenzo-p-dioksyny (PCDD), polichlorowane dibenzofurany (PCDF) czy polichlorowane dibenzoetery (PCDE). Do grupy tej należy również zaliczyć wykrywane ostatnio w osoczu i tkance tłuszczowej ludzi związki bromopochodne stosowane powszechnie jako tzw. substancje uniepalniające (ang.: *brominated flame retardants*), np.: heksabromobenzen (HBB), polibromowane bifenyly (PBB) czy polibromowane dibenzoetery (PBDE).

Oszacowanie toksycznego działania większości ksenobiotyków na pojedyncze organizmy, gatunki czy też całe ekosystemy jest zadaniem niezwykle złożonym i trudnym. Wśród przyczyn tego oczywistego faktu należy wymienić m.in.:

- bardzo niskie stężenia ksenobiotyków w poszczególnych elementach środowiska,
- trudności w oszacowaniu dawki progowej dla danego efektu toksycznego lub brak takiej dawki w przypadku działania kancerogennego czy mechanizmów opartych o działanie receptorowe [5, 8]; trudności w ocenie zależności dawka-efekt [11],
- wielokierunkowość mechanizmów działania pojedynczych substancji [8],
- abiotyczne i biotyczne przemiany prowadzące do powstawania nowych, często nieznanych związków, wykazujących odmienne cechy toksykodynamiczne od substancji macierzystej [59],
- interakcje toksykologiczne między substancjami toksycznymi po ich dostaniu się do organizmu,
- trudności w wyborze, interpretacji i ekstrapolacji wyników badań laboratoryjnych *in vivo* i *in vitro* na warunki rzeczywiste [53].

## DYSFUNKCJA UKŁADU HORMONALNEGO

Układ hormonalny jest drugim, poza nerwowym, układem organizmu regulującym i koordynującym czynności narządów oraz utrzymującym homeostazę organizmu. Oddziałuje on na tkanki i narządy docelowe za pośrednictwem informacji zakodowanych w postaci hormonów wydzielanych przez gruczoły dokrewne oraz komórki znajdujące się w różnych narządach wewnętrznych.

Obecnie wiadomo jest, że wiele chemicznych zanieczyszczeń środowiska może zaburzać równowagę układu hormonalnego wywołując różnorodne skutki zdrowotne zarówno u ludzi, jak i zwierząt [12, 19]. Związki takie, zwane po angielsku „*Endocrine disruptors – EDs*”, są definiowane jako substancje egzogenne powodujące niekorzystne skutki zdrowotne w organizmie bądź u jego potomstwa w efekcie zaburzeń wywołanych w układzie hormonalnym [62]. Związki, których aktywność hormonalna została udowodniona jedynie w modelach *in vitro* należy traktować jako związki o potencjalnej możliwości wywoływania zmian w układzie hormonalnym [29].

Biorąc pod uwagę złożoność układu hormonalnego, mechanizmy działania ksenobiotyków wywołujące jego dysfunkcję są niezwykle skomplikowane i nie do końca poznane. Skutki mogą być szczególnie niebezpieczne w okresie życia płodowego oraz dzieciństwa ze względu na brak ukształtowanych mechanizmów i sprzężeń zwrotnych regulujących działanie, syntezę i wydalanie hormonów. Może to prowadzić do nieodwracalnych zmian ujawniających się niekiedy nawet z dużym opóźnieniem [9, 11, 42, 49].

W tabeli I przedstawiono listę chemicznych zanieczyszczeń środowiska o udowodnionym, bądź prawdopodobnym działaniu na układ hormonalny i rozrodczy. Rycina 1 ilustruje różnorodność struktury chemicznej wybranych ksenoestrogenów.

Na rycinie 2 przedstawiono schemat dróg, za pośrednictwem których ksenoestrogeny mogą powodować dysfunkcję układu hormonalnego w organizmach zwierzęcych i u człowieka. Podstawowym źródłem narażenia na te związki jest żywność; w mniejszym stopniu dostają się one do organizmu za pośrednictwem układu oddechowego czy przez skórę. Po osiągnięciu osocza wiążą się z białkami, bądź pozostają tam w postaci niezwiązanej. W wyniku przemian metabolicznych mogą ulegać przekształceniu do substancji nieaktywnych i/lub wydaleni z moczem bądź innymi drogami. Część z nich dostaje się do tkanek i narządów docelowych, gdzie wywołuje określony efekt łącząc się z receptorem bądź na drodze innych mechanizmów. Niektóre związki zyskują aktywność hormonalną w organizmie dopiero po przemianie do aktywnego metabolitu; może to również prowadzić do zmiany kierunku działania związku. W sytuacji gdy ksenobiotyk jest związkiem persystentnym, może on kumulować się w tkankach i narządach (np. w tkance tłuszczowej), skąd następnie może ulegać powolnemu uwalnianiu się do krwioobiegu [9, 65], co w wielu przypadkach przedłuża czas jego działania do całego życia narażonego organizmu.

Substancje wywołujące dysfunkcję układu hormonalnego mogą działać m.in. na drodze [11, 21, 58, 65]:

- konkurencyjnego łączenia się z odpowiednimi receptorami (aktywacja lub inhibicja),
- hamowania syntezy endogennych hormonów,

Tabela I. Niektóre związki chemiczne występujące w środowisku o udowodnionym lub prawdopodobnym działaniu na układ hormonalny [19, 68].  
Selected chemicals with widespread distribution in the environment reported to have reproductive and endocrine-disrupting effects.

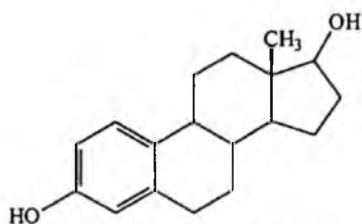
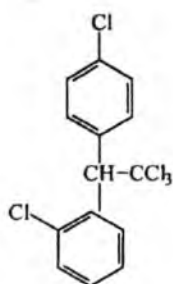
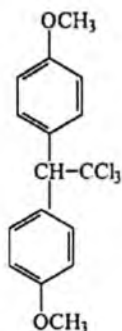
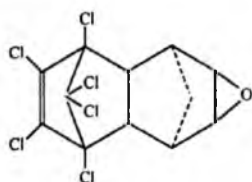
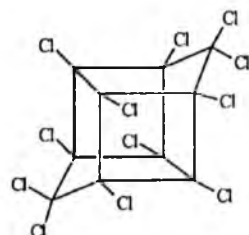
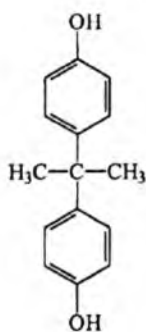
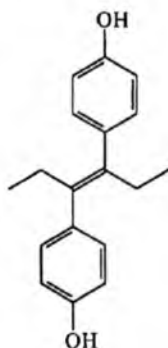
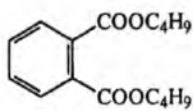
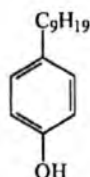
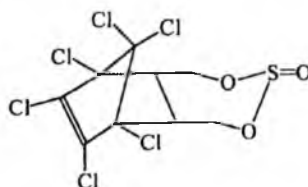
<b>HERBICYDY</b>		
- 2,4-D	- Bromacyl	- Pikloram
- 2,4,5-T	- Linuron	- Pendimetalina
- Alachlor*	- Metrybuzyna	- Pronamid
- Amitrol	- Nitrofen	- Symazyna
- Atrazyna	- Parakwat	- Trifluralina
<b>FUNGICYDY</b>		
- Benomyl	- Heksachlorobenzen*	- Winklozolina
- Fenarimol	- Mankozeb	- Zineb
- Fenbukonazol	- Maneb	- Ziram
<b>INSEKTYCYDY</b>		
- Aldryna*	- Endryna*	- Metomyl
- Bifentryna	- Fenitroton	- Metoksychlor
- Chlordan (i oxy-chlordan)*	- $\beta$ -HCH*	- Mireks*
- Chlordekon	- Heptachlor (i epoksyd)*	- Paration
- DDT (oraz DDE, DDD)*	- Karbaryl	- Syntetyczne pyretroidy
- Dikofol*	- Karbofuran	- Toksafen*
- Dieldryna*	- Lindan ( $\gamma$ -HCH)	- Transnonachlor*
- Dimetoat	- Malation	
- Endosulfan ( $\alpha$ i $\beta$ )		
<b>INNE BIOCYDY</b>		
- Aldikarb*	- ETU	- Pentachlorofenol
- DBCP	- Pentachlorobenzen	
<b>PRODUKTY I ZANIECZYSZCZENIA PRZEMYSŁOWE</b>		
- 4-OH-alkilofenole*	- Hydroksy-PCB*	- PCDE*
- 4-OH-bifenyl*	- Metale (glin, kadm, ołów, rtęć)	- Rezorcyrol
- Benzo(a)piren	- Octan winylu	- PCDF (furany)*
- BHA*	- PBB*	- Radioaktywne izotopy jodu
- Bisfenol A*	- PCB*	- Styreny
- Disiarczek węgla	- PCDD (dioksyny)*	- Tiocyjanki
- Ftalany*		

\* - związki o działaniu estrogenym

- inhibicji łączenia endogennych hormonów ze specyficznymi białkami transportującymi hormon z miejsca syntezy do punktu docelowego,
- modyfikacji metabolizmu endogennych hormonów,
- modyfikacji poziomu receptorów w komórkach.

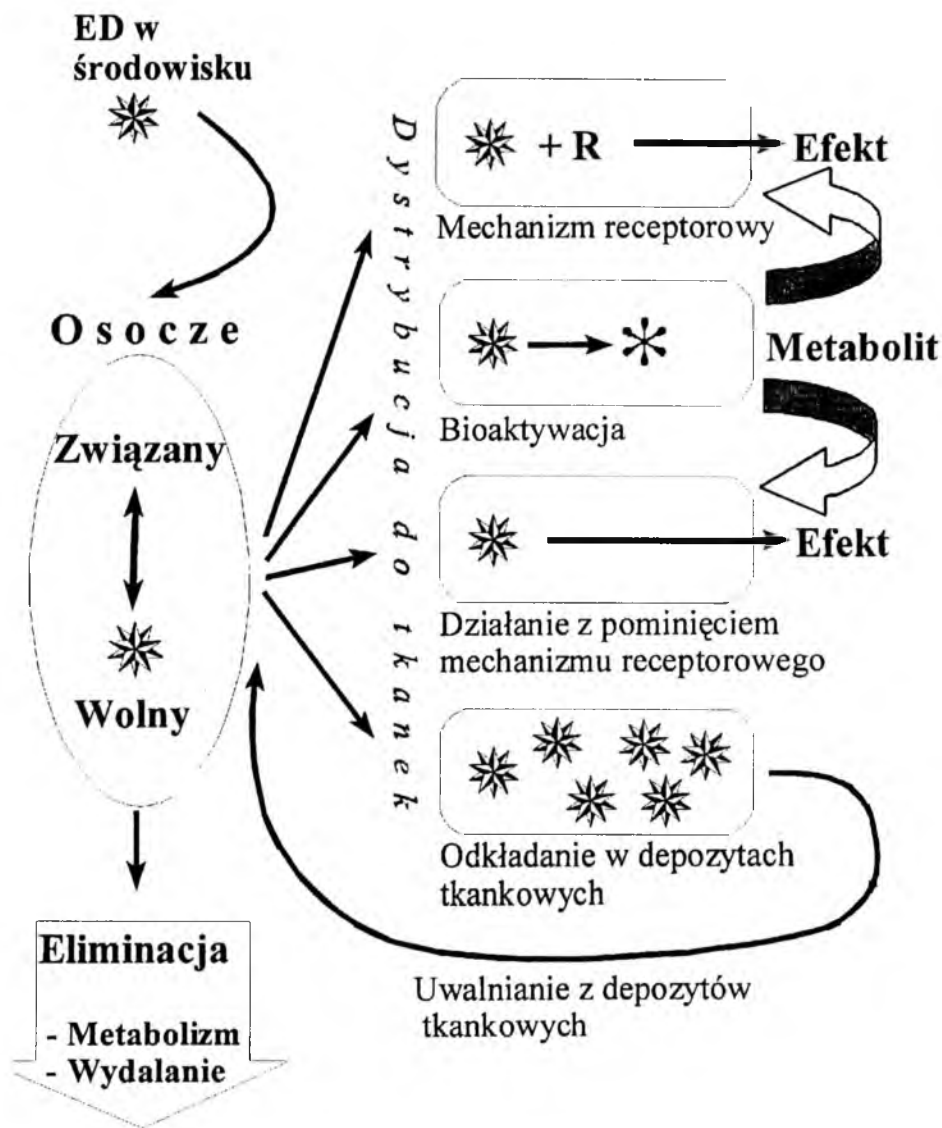
Wśród skutków zdrowotnych łączonych, niekiedy jednak z dużą niepewnością, z narażeniem człowieka na te związki wymienia się m.in. [12, 19, 21, 29, 43, 65]:

- wzrost liczby przypadków nowotworów:
  - sutka (u kobiet),
  - jąder,
  - prostaty,

**17β-estradiol****o,p'-DDT****p,p'-metoksychlor****Dieldryna****Mireks****Bisfenol A****DES  
(dietylostilbestrol)****Ftalan dibutyłu****p-nonylfenol****Endosulfan**

Ryc. 1. Struktura wybranych związków wykazujących aktywność estrogeną  
Structure of selected xenoestrogens

- postępujące w czasie zmniejszanie się ilości i jakości plemników,
- wzrost liczby przypadków wrodzonych wad rozwojowych u chłopców:



Ryc. 2. Ogólny schemat losów związków powodujących dysfunkcję układu hormonalnego w organizmach zwierząt i u człowieka [9]

Overview of endocrine disruptors' fate in animal and human organisms

- wewnątrzta,
- spożycia,
- wzrost liczby przypadków torbielowatości jajników i zewnętrznej gruczolistości macicy (endometriozy),
- skrócenie trwania laktacji,

- zmniejszanie się proporcji urodzeń chłopców w stosunku do dziewczynek,
- wcześniejsze dojrzewanie płciowe dziewczynek,
- obniżony rozwój psychomotoryczny u dzieci.

Z powyższego zestawienia wynika jasno, że większość zmian dotyczy zaburzeń funkcjonowania hormonów płciowych. Wciąż jednak brakuje bezsprzecznych i wyczerpujących dowodów jednoznacznie potwierdzających te przypuszczenia co zostało wyczerpująco przedstawione w pracach przeglądowych *Safe'a* [51, 52].

Skutki zdrowotne narażenia zwierząt na substancje powodujące dysfunkcję układu hormonalnego są lepiej poznane i obejmują one [19]:

- zaburzenia płodności (ssaki, ptaki, ryby, skorupiaki),
- spadek sukcesu gniazdowego (ptaki, ryby, gady),
- demaskulinizację i feminizację (ssaki, ptaki, ryby, gady),
- defeminizację i maskulinizację (ryby),
- zaburzenia układu odpornościowego (ssaki, ptaki),
- zaburzenia funkcjonowania tarczycy (ptaki, ryby).

#### KSENOESTROGENY A RAK SUTKA

W ostatnich latach, w literaturze naukowej, szczególnie wiele uwagi poświęca się substancjom zdolnym do wywoływania odpowiedzi biologicznej zbliżonej do działania żeńskich hormonów płciowych (np. 17- $\beta$ -estradiolu), tzw. ksenoestrogenów. Ich działanie łączy się z notowanym na całym świecie, trudnym do wyjaśnienia stałym wzrostem zachorowalności i umieralności na raka sutka [2, 22, 23, 32, 38, 47, 67]. W większości rozwiniętych państw świata jest on najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet (około 20% wszystkich nowotworów złośliwych). O skali problemu świadczy fakt, że w Polsce co roku stwierdza się około 8 do 10 tysięcy nowych zachorowań i 5 do 6 tysięcy zgonów (3–4 krotny wzrost w porównaniu z rokiem 1963), a standaryzowane względem wieku współczynniki zachorowalności i umieralności wynoszą odpowiednio 30/100 000 i 16/100 000 (2-krotny wzrost w porównaniu z rokiem 1963) [35, 69]. Dla porównania, szacuje się, że w Stanach Zjednoczonych w 2000 roku liczba nowych przypadków złośliwego raka sutka osiągnie niemal 200 000, a zgonów z tego powodu przekroczy 40 000 [1, 4].

Mimo ogromnego postępu jaki dokonał się w rozpoznawaniu i leczeniu raka sutka, przyczyny rozwoju tej choroby wynikające ze skomplikowanych interakcji pomiędzy genami, hormonami oraz środowiskowymi czynnikami fizycznymi i chemicznymi nie zostały dotąd dokładnie określone. Około 20–25% przypadków rodzinnie występujących raków sutka ma wieloczynnikowe podłoże genetyczne. Powszechnie uważa się, że nie więcej niż 10% przypadków jest efektem dziedzicznej predyspozycji (mutacje genów supresorowych: BCRA1 zlokalizowanego w chromosomie 17q21, BCRA2 w chromosomie 13q12–13 i p53 w chromosomie 17p13) [1, 27, 35, 44]. W najnowszych badaniach sugeruje się, że odsetek ten może jednak sięgać 18% [64]. Panuje jednak zgodność, że zdecydowana większość przypadków raka sutka (nie mniej niż 2/3) powstaje spontanicznie jako wynik działania na system hormonalny różnych czynników endogennych lub środowiskowych.

Wyniki badań epidemiologicznych wskazują, że jednym z najistotniejszych czynników w etiologii raka sutka jest czas trwania ekspozycji na hormony jajnika – estrogeny i progestageny. Największy wzrost ryzyka zachorowania na raka sutka występuje w wyniku nasilonej ekspozycji na estrogeny (zwłaszcza niezwiązany z albuminami osocza estradiol) oraz progesteron. Powodują one wzmożoną proliferację komórek (efekt mitogenny) zwiększając w ten sposób prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji na skutek błędnej replikacji DNA w procesie podziału komórkowego, a więc czyniąc je bardziej wrażliwymi na działanie mutagenów [27, 31, 35].

#### MECHANIZMY KSENOESTROGENNEGO DZIAŁANIA NIEKTÓRYCH ZWIĄZKÓW CHLOROORGANICZNYCH

Istnieją dwie podstawowe hipotezy wyjaśniające estrogeny charakter działania niektórych ksenobiotyków, prowadzący do nadmiernej proliferacji komórek, m.in. gruczołu piersiowego i w konsekwencji zwiększający prawdopodobieństwo powstania nowotworu sutka. Pierwsza z nich zakłada możliwość oddziaływania tych związków z receptorem estrogenowym (mechanizm receptorowy). Według drugiej, niektóre związki chloroorganiczne zmieniają metabolizm estradiolu na korzyść wzmożonej produkcji metabolitów o silniejszym powinowactwie do receptora estrogenowego, co w konsekwencji prowadzi do wzmożonej proliferacji i zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju nowotworu (mechanizm metaboliczny) [24].

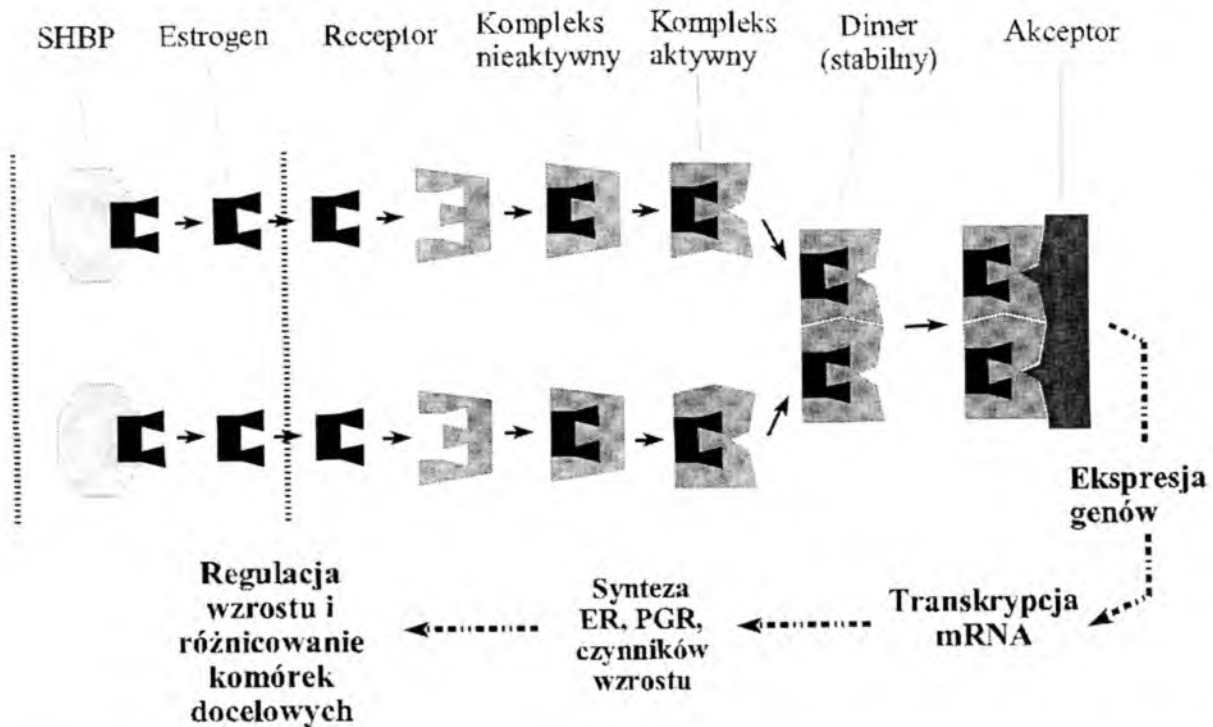
#### Mechanizm receptorowy

Estrogeny są endogennymi hormonami sterydowymi syntetyzowanymi w organizmie kobiety w jajnikach pod wpływem sygnałów przekazywanych z mózgu (hormon folikulotropowy – FSH, hormon luteinizujący – LH oraz luliberyna – LH-RH) [18, 39]. We krwi łączą się ze specyficznymi białkami transportowymi (SHBG – *sex hormone binding globulins*), z którymi są przenoszone do komórek organów docelowych, tj. gruczołu piersiowego i narządów płciowych. Tam, jako cząsteczki lipofilowe, wnikają do wnętrza komórki drogą biernej dyfuzji i łączą się z receptorami estrogenowymi (ER) zlokalizowanymi głównie w jądrze, powodując ich uaktywnienie. Następnie aktywne kompleksy hormon (ligand) – receptor dimeryzują, co powoduje ich stabilizację i umożliwia wiązanie się z tzw. elementami odpowiedzi hormonalnej na chromatynie jądrowej, a w rezultacie ekspresję odpowiednich genów wyrażającą się syntezą swoistych białek (bądź jej regulacją) poprzez transkrypcję mRNA. Do białek tych należą niektóre czynniki wzrostu i ich receptory oraz receptory progesteronowe i estrogenowe. Ostatecznym rezultatem jest regulacja wzrostu i różnicowanie komórek docelowych [17, 21, 35]. Mechanizm działania receptora estrogenowego przedstawiono na rycinie 3.

Pomimo różnic strukturalnych z estradiolem (ryc. 1), niektóre związki chloroorganiczne, np. DDT i jego metabolity (szczególnie o,p'-DDT), metoksychlor (po metabolicznej demetylacji), endosulfan, czy toksafen, wykazują działanie analogiczne do estrogenów [2, 13, 16, 32, 57].

Siła działania tych związków, stwierdzona w wielu systemach *in vitro*, wynosi zaledwie 0,001 do 0,000001 wartości uzyskiwanych dla estradiolu [32, 54]. Z drugiej strony należy jednak pamiętać, że bezpośrednia aktywność hormonomimetyczna nie jest jedynym





Ryc. 3. Ogólny schemat działania receptora estrogenowego  
Outline of estrogen receptor action

mechanizmem działania tych związków. Słabość działania ksenoestrogenów może być rekompensowana przez jeden lub kilka następujących czynników [20, 37, 43]:

- łatwiejszy dostęp do receptora,
- większe powinowactwo do ER,
- trwalsze wiązanie z ER,
- słabsze, w porównaniu z estradiolem, wiązanie z białkami transportowymi osocza (w efekcie – łatwiejsze uwalnianie ksenoestrogenów w tkankach docelowych),
- możliwość wywoływania zmian konformacji ER ułatwiającej wiązanie z estradiolem,
- ułatwianie dimeryzacji par receptor-ligand.

W rezultacie efekty działania ksenoestrogenów mogą być wielokrotnie większe od spodziewanych, wynikających ze stężenia i znanej siły działania. Dodatkowym czynnikiem potęgującym aktywność estrogeną może być synergizm działania związków chemicznych. W badaniach *in vitro* McLachlan i Arnold [43] wykazali, że efekt działania kombinacji słabych estrogenów (dielidryna, endosulfan, toksafen i chlordan) może być 160-1600 razy większy od sumy spodziewanego działania pojedynczych związków. Innym badaczom nie udało się jednak uzyskać takich wyników.

Rozważając estrogeną aktywność persystentnych związków chloroorganicznych należy również zapominać o ich właściwościach fizyko-chemicznych zapewniających wysoką biodostępność ze źródeł narażenia oraz umożliwiających kumulację w tkance tłuszczowej.

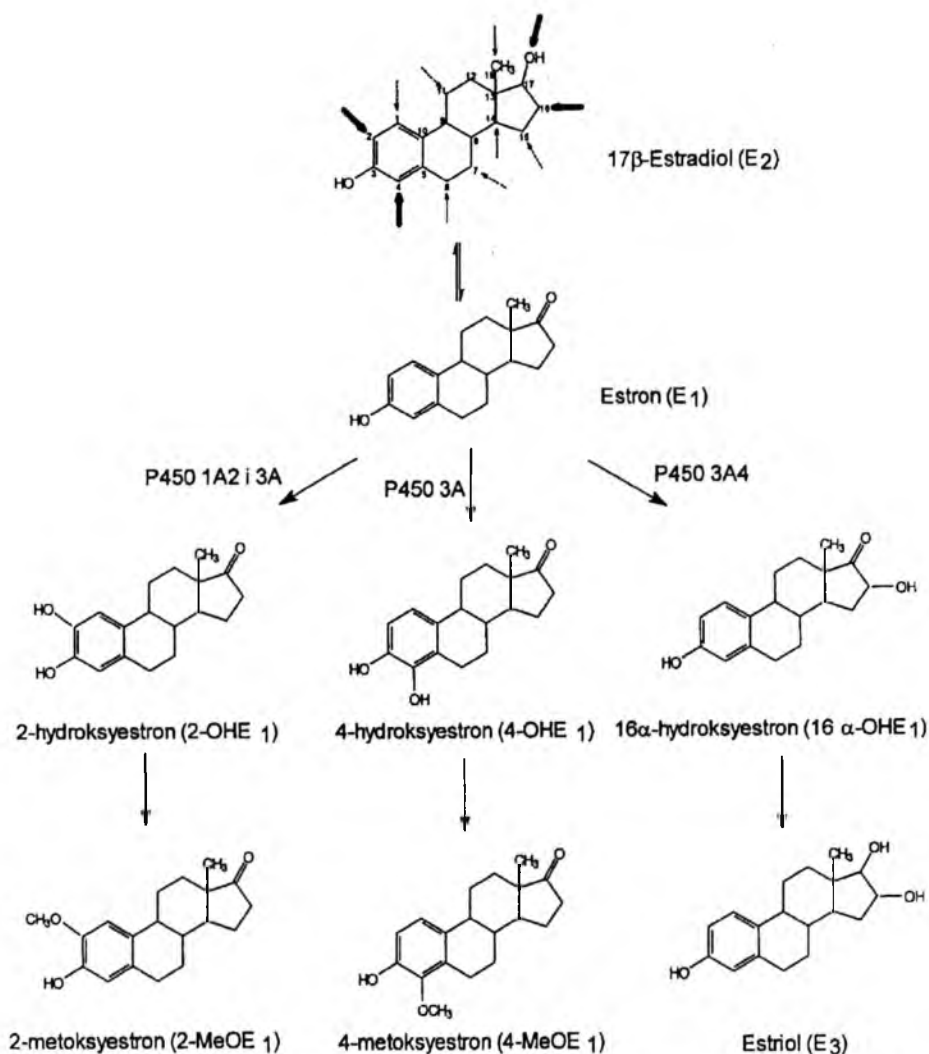
Efektom omawianych powyżej mechanizmów jest działanie estrogenne. Wiadomo jednak, że niektóre związki estrogenne, np.: p,p'-DDE, o,p'-DDT mogą jednocześnie wykazywać aktywność antyandrogeną [56].

Ksenobiotyki z grupy związków chloroorganicznych mogą też działać w sposób odwrotny (antyestrogenie), tj. trwale blokować receptor estrogenowy uniemożliwiając ekspresję genów związkom endogennym.

### Mechanizm metaboliczny

Metabolizm 17- $\beta$ -estradiolu jest procesem niezwykle skomplikowanym. Zachodzi on zarówno w wątrobie, jak i komórkach tkanek oraz organów docelowych prowadząc do powstania dużej liczby związków pochodnych o różnej aktywności hormonalnej, które następnie są usuwane z organizmu w postaci m.in. estrów kwasów tłuszczowych, glukuronianów czy siarczanów [72]. Na rycinie 4 przedstawiono 3 najlepiej poznane szlaki przemian 17- $\beta$ -estradiolu ( $E_2$ ) po jego utlenieniu do estronu ( $E_1$ ).

Pierwszy polega na wprowadzeniu rodnika hydroksylowego w pozycji 2 przy udziale hydroksylaz związanych z cytochromem P450 1A2 oraz 3A, w efekcie czego powstaje 2-hydroksyestron (2-OHE<sub>1</sub>). Cząsteczki 2-OHE<sub>1</sub> mają bardzo słabe działanie estrogenne i nie wykazują działania genotoksycznego. Metabolit ten jest bardzo szybko wydalany z moczem w postaci m.im. siarczanu, glukuronianu czy pochodnych O-metylowych. W drugim, hydroksylacja cząsteczki w pozycji 16 przy udziale cytochromu P450 3A4 prowadzi do powstania 16- $\alpha$ -hydroksyestronu (16-OHE<sub>1</sub>). Metabolit ten wykazuje dużą aktywność hormonalną i ma zdolność do trwałego, kowalencyjnego wiązania się z ER wywołując efekt mitogeny znacznie silniejszy od macierzystego 17- $\beta$ -estradiolu.



Strzałki przy wzorze 17β-estradiolu wskazują atomy węgla podlegające reakcjom utleniania za pośrednictwem enzymów związanych z cytochromem P450. Pogrubione strzałki wskazują główne kierunki przemian metabolicznych.

Ryc. 4. Kierunki najważniejszych przemian metabolicznych 17β-estradiolu [14, 55, 72]  
The main pathways of 17β-estradiol metabolism

Ponadto charakteryzuje się on słabą siłą wiązania do białek transportowych (SHBG). W badaniach *in vitro* na hodowlach ludzkich komórek nabłonkowych gruczołu sutkowego wykazano, że może on działać jako bezpośredni inicjator zmian preneoplastycznych (wpływając na nieplanową syntezę DNA czy ekspresję onkogenów) [14, 15, 22–24, 55, 60, 72]. Trzeci, podstawowy szlak przemian metabolicznych prowadzi do

powstania 4-hydroksyestronu (4-OHE<sub>1</sub>), podejrzanego o działanie analogiczne do 16-OHE<sub>1</sub>. Reakcja ta zachodzi przy udziale cytochromu P450 z rodziny 3A oraz 1B1. Metabolit ten jest silnym kancerogenem wywołującym nowotwory nerek u chomików, prawdopodobnie na drodze bezpośredniego uszkodzenia DNA w wyniku reakcji wolnorodnikowych [72]. Mechanizm i ewentualne skutki działania u człowieka wydają się być jednak wątpliwe [15, 24].

Wykazano, że wiele związków chloroorganicznych może oddziaływać na system enzymów związanych z cytochromem P-450, wpływając m.in. na zmianę kierunku przemian metabolicznych estradiolu. Zaburzenia równowagi przemian tego hormonu prowadzące do wzmoczonej syntezy 16-OHE<sub>1</sub> kosztem 2-OHE<sub>1</sub> uznano za czynnik zwiększający ryzyko powstania nowotworu sutka. W badaniach *in vitro* wykazano, że działanie takie wykazują m.in. izomery i metabolity DDT, kepon,  $\gamma$ -HCH (lindan) [14] czy niektóre kongenery PCB zawierające 2 i więcej atomów chloru podstawionych w pozycji orto [67]. Bradlow i wsp. [14] zasugerowali przyjęcie stosunku stężeń 16-OHE<sub>1</sub> do 2-OHE<sub>1</sub> za biologiczny wskaźnik ryzyka wystąpienia raka sutka, a substancje powodujące jego wzrost, za potencjalne kancerogeny wywołujące ten typ nowotworu. Hipoteza ta ma jednak swoich przeciwników, którzy w swoich badaniach nie znaleźli różnic w stosunku obu metabolitów w moczu pacjentek w wieku pomenopauzalnym ze stwierdzonym rakiem sutka i kobiet z grupy odniesienia [61].

Należy również wspomnieć, że niektóre związki chloroorganiczne o działaniu anty-estrogennym, jak np. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyna (TCDD) czy niektóre kongenery PCB o strukturze przestrzennej analogicznej do TCDD (brak atomów chloru w pozycjach orto, atomy chloru podstawione w pozycjach 3, 4 i/lub 5 obu pierścieni), wywołują efekt odwrotny, wzmagając 2-hydroksylację estronu [2, 3, 15, 67]. Działanie to ma swoje podstawy w aktywacji receptora Ah (AhR) i wzmoczonej ekspresji genów m.in. CYP1A1 i CYP1A2, a także inhibicji genów, których ekspresja jest efektem działania estradiolu [70].

Należy dodać, że wiele substancji naturalnie występujących z żywności (tzw. fito-estrogenów) stymuluje przemianę 17- $\beta$ -estradiolu do 2-OHE<sub>1</sub>. Należą do nich m.in. związki takie jak indol-3-karbinol czy genisteina, występujące w soi czy warzywach kapustnych [14, 23].

## BADANIA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Wzrastająca liczba doniesień na temat estrogennego działania niektórych związków chloroorganicznych skłoniła w latach 90-tych wiele zespołów badawczych do podjęcia badań mających na celu potwierdzenie (bądź zaprzeczenie) istnienia zależności między poziomem tych związków w próbkach pochodzących od kobiet (tkanka tłuszczowa z gruczołu piersiowego, tkanka tłuszczowa podskórna, osocze), a występowaniem raka sutka.

Badania te były wykonywane przede wszystkim w Stanach Zjednoczonych [7, 26, 30, 34, 36, 46, 66, 71] i Kanadzie [25], oraz w niektórych krajach europejskich [28, 33, 40, 48, 63]. Tematyką tą zajęli się również naukowcy w Meksyku [41] i Brazylii [45].

W przypadku badania osocza, najczęściej analizowane są próbki zarchiwizowane, pobrane często kilkanaście lat wcześniej, w trakcie zakrojonych na szeroką skalę, wielokierunkowych badań prospektywnych. Grupę badaną stanowią kobiety, u których

klinicznie stwierdzono nowotwór złośliwy sutka. Uzyskane wyniki porównywane są z osoczem kobiet zdrowych.

Drugą, podstawową matrycą, w której oznaczane są związki chloroorganiczne jest tkanka tłuszczowa pochodząca przeważnie z gruczołu piersiowego. Próbkę tłuszczu w grupie badanej pobierane są przy okazji chirurgicznego usuwania guzów złośliwych, natomiast grupę odniesienia stanowią kobiety z chirurgicznie usuwanymi tzw. „łagodnymi schorzeniami gruczołów sutkowych” (ang. *benign breast diseases* – BBD), np. gruczolakowłókniakami czy torbielami, spełniającymi warunek braku złośliwości zarówno w obrazie klinicznym jak i histopatologicznym. W pojedynczych przypadkach próbki pobiera się od kobiet zdrowych (z pośladek) bądź od ofiar bliżej niesprecyzowanych wypadków śmiertelnych.

Przy ocenie wyników pod uwagę bierze się szereg zmiennych, mogących mieć wpływ na wyniki, m.in.: przypadki nowotworu sutka u krewnych pierwszego stopnia dawczyń, wiek wystąpienia pierwszej miesiączki, wiek przy urodzeniu pierwszego dziecka, liczbę i czas trwania laktacji, oraz obecność (lub brak) receptorów estrogenowych w komórkach nowotworowych.

Niezależnie od badanej matrycy, uzyskiwane wyniki są rozbieżne. W zależności od reprezentatywności grup: badanej i odniesienia, doboru analizowanych związków chloroorganicznych oraz statystycznych metod oceny wyników, różni autorzy stwierdzają istnienie dodatnich lub ujemnych korelacji między stężeniami poszczególnych związków w badanej matrycy, a występowaniem nowotworu złośliwego sutka u kobiet, bądź brak jakiegokolwiek korelacji.

Nie istnieją więc jednoznaczne dowody potwierdzające hipotezę, że większe prawdopodobieństwo wystąpienia raka sutka jest związane z wyższymi poziomami związków chloroorganicznych w depozytach tkankowych. Z drugiej strony nie można również kategorycznie zaprzeczyć istnieniu takiej zależności. Przeciwnicy ww. hipotezy bardzo często posługują się negatywnymi wynikami uzyskanymi na podstawie badań próbek osocza, które są na ogół bardziej reprezentatywne ilościowo i jakościowo, niż wyniki badań tkanki tłuszczowej. Wydaje się jednak wątpliwe, czy aktualnie stwierdzone stężenie persistencyjnych związków chloroorganicznych we krwi odzwierciedla ich poziomy w depozytach tkankowych, a więc w konsekwencji narażenie w ciągu całego życia. Z danych piśmiennictwa wiadomo, że z wyjątkiem p,p'-DDE i kongeneru PCB 153, nie stwierdza się korelacji między poziomami tych związków w osoczu i tkance tłuszczowej. Tak więc, wyniki badań osocza mogą prowadzić do fałszywych wniosków [6].

Z oczywistych powodów przyjęte modele doświadczalne nie uwzględniają narażenia na egzogenne estrogeny w najbardziej krytycznych etapach rozwoju (okres życia płodowego, dojrzewanie), czego skutki mogły ujawnić się wiele lat później [50]. Prowadzone badania umożliwiają jedynie oszacowanie bieżącego narażenia na związki chloroorganiczne na podstawie ich poziomów w depozytach tkankowych. Jednak z uwagi na trwałość tych związków wykrywane stężenia świadczą pośrednio o wcześniejszym narażeniu na ksenoestrogeny chloroorganiczne. Dlatego badania nad zależnościami pomiędzy stężeniami związków chloroorganicznych w depozytach tkankowych, a występowaniem raka sutka mają istotne znaczenie i są kontynuowane w wielu ośrodkach naukowych na świecie.

P. Struciński, J.K. Ludwicki, K. Góralczyk, K. Czaja

## ENDOCRINE DISRUPTING ACTION OF PERSISTENT ORGANOCHLORINE COMPOUNDS – AN OVERVIEW

### Summary

The presence of many chemical pollutants in the environment and their potential impact to human health creates rather justified anxiety. Many of these pollutants feature such unwelcome characteristics as: persistence in different environmental media, ability to bioaccumulate and biomagnify in individual food chains, as well as ability to undergo long-range atmospheric transport. Compounds meeting these criteria include above all a large group of persistent organochlorine compounds. Recently, debate has increased concerning endocrine disrupting activity of these compounds and especially their ability to produce biologic responses comparable to those of endogenous estrogens (e.g. 17 $\beta$ -estradiol).

It has been hypothesized that these compounds, among others, may be associated with increased incidence of breast cancer and other estrogen-related cancers in women due to increased proliferation of breast epithelial cells. The organochlorine xenoestrogens may produce this effect following binding to a hormone receptor (with or without metabolic activation) or by affecting the 17 $\beta$ -estradiol pathways leading to increased formation of more potent estrogenic metabolites.

Numerous studies performed since early 1990s have examined the relationship between organochlorines levels in serum or adipose tissue and breast cancer, but the results are not consistent. This may be caused by various criteria of selecting the case and control groups, different compounds analyzed or different statistical approaches. None of these studies included endocrine disruptors' exposure in early and critical stages of development – from conception up to puberty age – the results of which would manifest in far future. Nevertheless the results of measurements, especially in adipose tissue are more reliable for this purpose because they reflect the whole life exposure and may be recognized as one of many environmental risk factors of cancer development.

### PIŚMIENNICTWO

1. ACS (American Cancer Society). The Breast Cancer Resources Center 1999, (<http://www.cancer.org>).
2. Adami H-O., Lipworth L., Titus-Ernstoff L., Hsieh C-C., Hanberg A., Ahlborg U., Baron J., Trichopoulos D.: Organochlorine compounds and estrogen-related cancers in women. *Cancer Causes and Control* 1995, 6, 551–566.
3. Ahlborg U.G., Lipworth L., Titus-Ernstoff L., Hsieh C-C., Hanberg A., Baron J., Trichopoulos D., Adami H-O.: Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: An assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 1995, 25, 463–531.
4. Alberg A.J., Lam A.P., Helzlsouer K.J.: Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 1999, 11, 435–441.
5. Andersen M.E., Conolly R.B., Faustman E.M., Kavlock R.J., Portier C.J., Sheenan D.M., Wier P.J., Ziese L.: Quantitative mechanistically based dose-response modelling with endocrine-active compounds, *Environ. Health Perspect.* 1999, 107, Suppl. 4, 631–638.
6. Archibeque-Engle S.L., Tessari J.D., Winn D.T., Keefe T.J., Nett T.M., Zheng T.: Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J. Toxicol. Environ. Health* 1997, 52, 285–293.
7. Aronson K.J., Miller A.B., Woolcott C.G., Sterns E.E., McCready D.R., Lickley L.A., Fish E.B., Hiraki G.Y., Holloway C., Ross T., Hanna W.M., SenGupta S.K., Weber J-P.: Breast adipose

- tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2000, 9, 55–63.
8. *Ashby J., Houthoff E., Kennedy S.J., Stevens J., Bars R., Jekat F.W., Campbell P., Van Miller J., Carpanini F.M., Randall L.P.*: The challenge posed by endocrine-disrupting chemicals, *Environ. Health Perspect.* 1997, 105, 164–169.
  9. *Ben-Jonathan N., Cooper R.L., Foster P., Hughes C.L., Hoyer P.B., Klotz D., Kohn M., Lamb D.J., Stancel G.M.*: An approach to the development of quantitative models to assess the effects of exposure to environmentally relevant levels of endocrine disruptors on homeostasis in adults. *Environ. Health Perspect.* 1999, 107, Suppl. 4, 605–611.
  10. *Bernes C.*: Persistent Organic Pollutants. A Swedish View of an International Problem. Swedish Environmental Protection Agency, Monitor 16, 1998.
  11. *Biggsby R., Chapin R.E., Daston G.P., Davis B.J., Gorski J., Grey E.L., Howdeshell K.L., Zoeller R.T., vom Saal F.S.*: Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development, *Environ. Health Perspect.* 1999, 107, Suppl. 4, 613–618.
  12. *Birnbaum L.S.*: Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics: Implication for policy and future research, *Environ. Health Perspect.* 1994, 102, 676–679
  13. *Bonfeld-Jørgensen E.C., Autrup H., Hansen J.C.*: Effect of toxaphene on estrogen receptor functions in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 1997, 18, 1651–1654.
  14. *Bradlow H.L., Davis D.L., Lin G., Sepkovic D., Tiwari R.*: Effects of pesticides on the ratio of 16 $\alpha$ /2-hydroxyestrone: A biologic marker of breast cancer risk. *Environ. Health. Perspect.* 1995, 103, Suppl. 7, 147–150.
  15. *Bradlow H.L., Davis D.L., Sepkovic D.W., Tiwari R., Osborne M.P.*: Role of the estrogen receptor in the action of organochlorine pesticides on estrogen metabolism in human breast cancer cell lines. *Sci. Total Environ.* 1997, 208, 9–14.
  16. *Bustos S., Denegri J.C., Diaz F., Tchernitchin A.N.*: p,p'-DDT is an estrogenic compound. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1988, 41, 496–501.
  17. *Calabrese E.J., Baldwin L.A., Kosteci P.T., Potter T.L.*: A toxicologically based weight-on-evidence methodology for the relative ranking of chemicals of endocrine disruption potential. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1997, 26, 36–40.
  18. *Chou K., Salem B.*: Endocrine system; in: *Encyclopedia of Toxicology* Vol. 1. ed. P. Wexler. Academic Press 1998, 531–535.
  19. *Colborn T., vom Saal F.S., Soto A.M.*: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.* 1993, 101, 378–384.
  20. *Coosen R., van Velsen F.L.*: Effects of the  $\beta$ -isomer of hexachlorocyclohexane on estrogen-sensitive human mammary tumor cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1989, 101, 310–318.
  21. *Danzo B.J.*: The effects of environmental hormones on reproduction. *Mol. Life Sci.* 1998, 54, 1249–1264.
  22. *Davis D.L., Bradlow H.L., Wolff M., Woodruff T., Hoel D.G., Anton-Culver H.*: Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ. Health Perspect.* 1993, 101, 372–377.
  23. *Davis D.L., Axelrod D., Osborne M.P., Telang N.T.*: Environmental influences on breast cancer risk. *Sci. Med.* 1997, 4 (3), 56–63.
  24. *Davis D.L., Axelrod D., Bailey L., Gaynor M., Sasco A.J.*: Rethinking breast cancer risk and the environment: The case for the precautionary principle. *Environ. Health. Perspect.* 1998, 106, 523–529.
  25. *Dewailly É., Dodin S., Verreault R., Ayotte L.S., Morin J., Brisson J.*: High organochlorine body burden in women with estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994, 86, 232–234.

26. Falck Jr. F., Ricci Jr. A., Wolff M.S., Godbold J., Deckers P.: Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch. Environ. Health* 1992, 47, 143–146.
27. Feigelson H.S., Henderson B.E.: Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis* 1996, 17, 2279–2284.
28. Hardell L., Lindström G., Liljegren G., Dahl P., Magnuson A.: Increased concentrations of octachlorodibenzo-p-dioxin in cases with breast cancer – results from a case-control study. *Eur. J. Cancer Prev.* 1996, 5, 351–357.
29. Harrison P.T.C., Holmes P., Humfrey C.D.N.: Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *Sci. Total Environ.* 1997, 205, 97–106.
30. Helzlsouer K.J., Alberg A.J., Huang H-Y., Hoffman S.C., Strickland P.T., Brock J.W., Burse V.W., Needham L.L., Bell D.A., Lavigne J.A., Yager J.D., Comstock G.W.: Serum concentrations of organochlorine compounds and the subsequent development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biom. Prev.* 1999, 8, 525–532.
31. Henderson B.E., Feigelson H.S.: Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000, 21, 427–433.
32. Houghton D.L., Ritter L.: Organochlorine residues and risk of breast cancer. *J. Am. Coll. Toxicol.* 1995, 14, 71–89.
33. Høyer A.P., Grandjean P., Jørgensen T., Brock J.W., Hartvig H.B.: Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* 1998, 352, 1816–1820.
34. Hunter D.J., Hankinson S.E., Laden F., Colditz G.A., Manson J., Willett W.C., Speizer F.E., Wolff M.S.: Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *New Engl. J. Med.* 1997, 337, 1253–1258.
35. Jassem J. (Red.): Rak sutka. Springer PWN, Warszawa 1998.
36. Krieger N., Wolff M.S., Hiatt R.A., Rivera M., Vogelmann J., Orentreich N.: Breast cancer and serum organochlorines: A prospective study among white, black, and Asian women. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994, 85, 589–599.
37. Kuiper G.G.J.M., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg B., Gustafsson J.-Å.: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology* 1998, 139, 4252–4263.
38. Laden F., Hunter D.J.: Environmental risk factors and female breast cancer. *Annu. Rev. Public Health* 1998, 19, 101–123.
39. Lasley B.L.: Female reproductive system. in: *Encyclopedia of Toxicology*, Vol. 3. ed. P. Wexler, Academic Press 1998, 23–38.
40. Liljegren G., Hardell L., Lindström G., Dahl P., Magnuson A.: Case-control study on breast cancer and adipose tissue concentrations of congener specific polychlorinated biphenyls, DDE and hexachlorobenzene. *Eur. J. Cancer Prev.* 1998, 7, 135–140.
41. López-Carillo L., Blair A., López-Cervantes M., Cebrián M., Rueda C., Reyes R., Mohar A., Bravo J.: Dichlorodiphenyltrichloroethane serum levels and breast cancer risk: A case-control study from Mexico. *Cancer Res.* 1997, 57, 3728–3732.
42. Lucier G.W.: Dose-response relationships for endocrine disruptors: What we know and what we don't know, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1997, 26, 34–35.
43. McLachlan J.A., Steven F. Arnold: Environmental estrogens. *Am. Sci.* 1996, 84 (5) (<http://www.amsci.org/amsci/articles/96articles/McLachla.html>).
44. McPherson K., Steel C.M., Dixon J.M.: Breast cancer – epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 1994, 309, 1003–1006.
45. Mendonca G.A.S., Andrada-Serpa M.J., Toledo H.H.C., Carmo P.A.O., Eluf-Neto J.: Serum organochlorines and risk of breast cancer in Rio de Janeiro, Brasil. *International Conference on Environmental and Occupational Cancer in Developing Countries*, 30.07–1.08.1998, Rio de Janeiro, Brazilia, 6.



46. *Moysich K.B., Ambrosone C.B., Vena J.E., Shields P.G., Mendola P., Kostyniak P., Greizerstein H., Graham S., Marshall J.R., Schisterman E.F., Freudenheim J.L.*: Environmental organochlorine exposure and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biom. Prev.* 1998, 7, 181–188.
47. *Musgrave M.A., Aronson K.J., Narod S., Hanna W., Miller A.B., McCready D.R.*: Breast cancer and organochlorines: a marker for susceptibility? *Surg. Oncol.* 1999, 7, 1–4.
48. *Mussalo-Rauhamaa H., Häsänen E., Pyysalo H., Kauppila R., Pantzar P.*: Occurrence of beta-hexachlorocyclohexane in breast cancer patients. *Cancer* 1990, 66, 2124–2128.
49. *Olea N., Olea-Serrano F., Lardelli-Claret P., Rivas A., Barba-Navarro A.*: Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol. Ind. Health* 1999, 15, 151–158.
50. *Saal vom F.S., Welshons W.V., Hansen L.G.*: Organochlorine residues and breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 1998, 338, 988.
51. *Safe S.H.*: Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem? *Environ. Health Perspect.* 1995, 103, 346–351.
52. *Safe S.H.*: Endocrine disruptors and human health – Is there a problem? An update. *Environ. Health Perspect.* 2000, 108, 487–493.
53. *Safe S., Connor K., Gaido K.*: Methods for xenoestrogen testing. *Toxicol. Letters* 1998, 102–103, 665–670.
54. *Safe S.H.*: Chemically-induced oestrogenic and anti-oestrogenic activity: Structure-dependent effects and molecular mechanisms of action. W: *Endocrine and hormonal toxicology*, Ed.: P.W. Harvey, K.C. Rush, A. Cockburn, John Wiley & Sons Ltd. 1999, 461–485.
55. *Shou M., Korzekwa K.R., Brooks E.N., Krausz K.W., Gonzalez F.J., Gelboin H.V.*: Role of human hepatic cytochrome P450 1A2 and 3A4 in the metabolic activation of estrone. *Carcinogenesis* 1997, 18, 207–214.
56. *Sohoni P., Sumpter J.P.*: Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.* 1998, 158, 327–339.
57. *Soto A.M., Chung K.L., Sonnenschein C.*: The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ. Health Perspect.* 1994, 102, 380–383.
58. *Soto A.M., Michaelson C.L., Precht N.V., Weill B.C., Sonnenschein C., Olea-Serrano F., Olea N.*: Assays to measure estrogen and androgen agonists and antagonists. in: *Reproductive Toxicology*, Ed. del Mazo, Plenum Press, New York 1998, 9–28.
59. *Struciński P., Góralczyk K., Ludwicki J.K.*: Abiotyczne i biotyczne przemiany persystentnych związków chloroorganicznych w środowisku, *Roczn. PZH* 1995, 46, 279–292.
60. *Telang N.T., Suto A., Wong G.Y., Osborne M.P., Bradlow H.L.*: Induction by estrogen metabolite 16 $\alpha$ -hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992, 84, 634–638.
61. *Ursin G., London S., Stanczyk F.Z., Gentschein E., Paganini-Hill A., Ross R.K., Pike M.C.*: Urinary 2-hydroxyestrone/16 $\alpha$ -hydroxyestrone ratio and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999, 91, 1067–1072.
62. *Vallack H.W., Bakker D.J., Brandt I., Broström-Lundén E., Brouwer A., Bull K.R., Gough C., Guardans R., Holoubek I., Jansson B., Koch R., Kuylenstierna J., Lecloux A., Mackay D., McCutcheon P., Mocarelli P., Taalman R.D.F.*: Controlling persistent organic pollutants – what next? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1998, 6, 143–175.
63. *Veer van't P., Lobbezoo I.E., Martín-Moreno J.M., Guallar E., Gómez-Aracena J., Kardinaal A.F.M., Kohlmeier L., Martin B.C., Strain J.J., Thamm M., Zoonen van P., Baumann B.A., Huttunen J.K., Kok F.J.*: DDT (dicophane) and postmenopausal breast cancer in Europe: Case-control study. *BMJ* 1997, 315, 81–85.

64. *Verkasalo P.K., Karpio J., Koskenvuo M., Pukkala E.*: Genetic predisposition, environment and cancer incidence: A nationwide twin study in Finland, 1976–1995. *Int. J. Cancer* 1999, 83, 743–749.
65. *Warhurst A.M.*: Introduction to hormone disrupting chemicals. 1999, (<http://website.lineone.net/~mwarhurst/index.html>).
66. *Wolff M.S., Toniolo P.G., Lee E.W., Rivera M., Dubin N.*: Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993, 85, 648–652.
67. *Wolff M.S., Toniolo P.G.*: Environmental organochlorine exposure as a potential etiologic factor in breast cancer. *Environ. Health Perspect.* 1995, 103, Suppl. 7, 141–145
68. WWF Canada (World Wildlife Fund): Chemicals in the environment reported to have reproductive and endocrine disrupting effects. WebGuide to endocrine disrupting chemicals 1999 (<http://www.wwfcanada.org/hormone-disruptors/science/edclist.html>).
69. *Zatoński W.A., Tyczyński J.E.*: Epidemiologia nowotworów złośliwych w Polsce w piętnastoleciu 1980–1994. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 1997.
70. *Zeyneloglu H.B., Arici A., Olive D.L.*: Environmental toxins and endometriosis. *Obst. Gyn. Clin. N. Am.* 1997, 24, 307–329.
71. *Zheng T., Holford T.R., Mayne S.T., Owens P.H., Ward B., Carter D., Dubrow R., Zahm S.H., Boyle P., Tessari J.*:  $\beta$ -benzene hexachloride in breast adipose tissue and risk of breast carcinoma. *Cancer* 1999, 85, 2212–2218.
72. *Zhu B.T. & Conney A.H.*: Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* 1998, 19, 1–27.

Otrzymano: 2000.02.03