

MARZENA MATEJCZYK, PATRYK ZALEWSKI

*Politechnika Białostocka
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Zakład Biologii Sanitarnej i Biotechnologii
Wiejska 45E, 15-351 Białystok
E-mail: m.matejczyk@pb.edu.pl*

ZWIĄZKI ENDOKRYNNIE AKTYWNE I ICH AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA*

WSTĘP

W ostatnich latach dużą uwagę poświęca się związkom, które, poza wywoływaniem określonych efektów w środowisku organizmu oraz zdolnością do biokumulacji, zdolne są do łączenia się z receptorami estrogenowymi. Wiele z nich, to substancje pochodzenia naturalnego, ale niektóre, to związki syntetyczne, wytwarzane przez przemysł chemiczny. Nazwano je endokrynnie aktywnymi, modyfikatorami hormonalnymi lub związkami zakłócającymi działanie endokryne, w skrócie EDCs (ang. endocrine-disrupting compounds, EDCs) (FALCONER i współaut. 2006).

Istnieje wiele naturalnych związków wykazujących działanie estrogenowe. Znane są też syntetycznie otrzymane substancje estrogenopodobne, które przenikają do środowiska i wywołują zmiany w żywych organizmach (MUELLER 2004).

Do tej pory zidentyfikowano wiele związków chemicznych zaburzających czynności endokryne. Substancje te zachowują się podobnie do naturalnych estrogenów [17- β -estradiol (E2), estriol (E3), estron (E1) i syntetycznych estrogenów (etinyloestradiol (EE2), dietylostilbestrol (DES)]. Na Rycinie 1 przedstawiono struktury chemiczne wybranych EDCs, zawierające w swojej budowie układ steranu (czyli steroidy i ich syntetyczne pochodne). Należą do nich fitoestrogeny (sitosterol, genisteina, daidzeina, kumestrol,

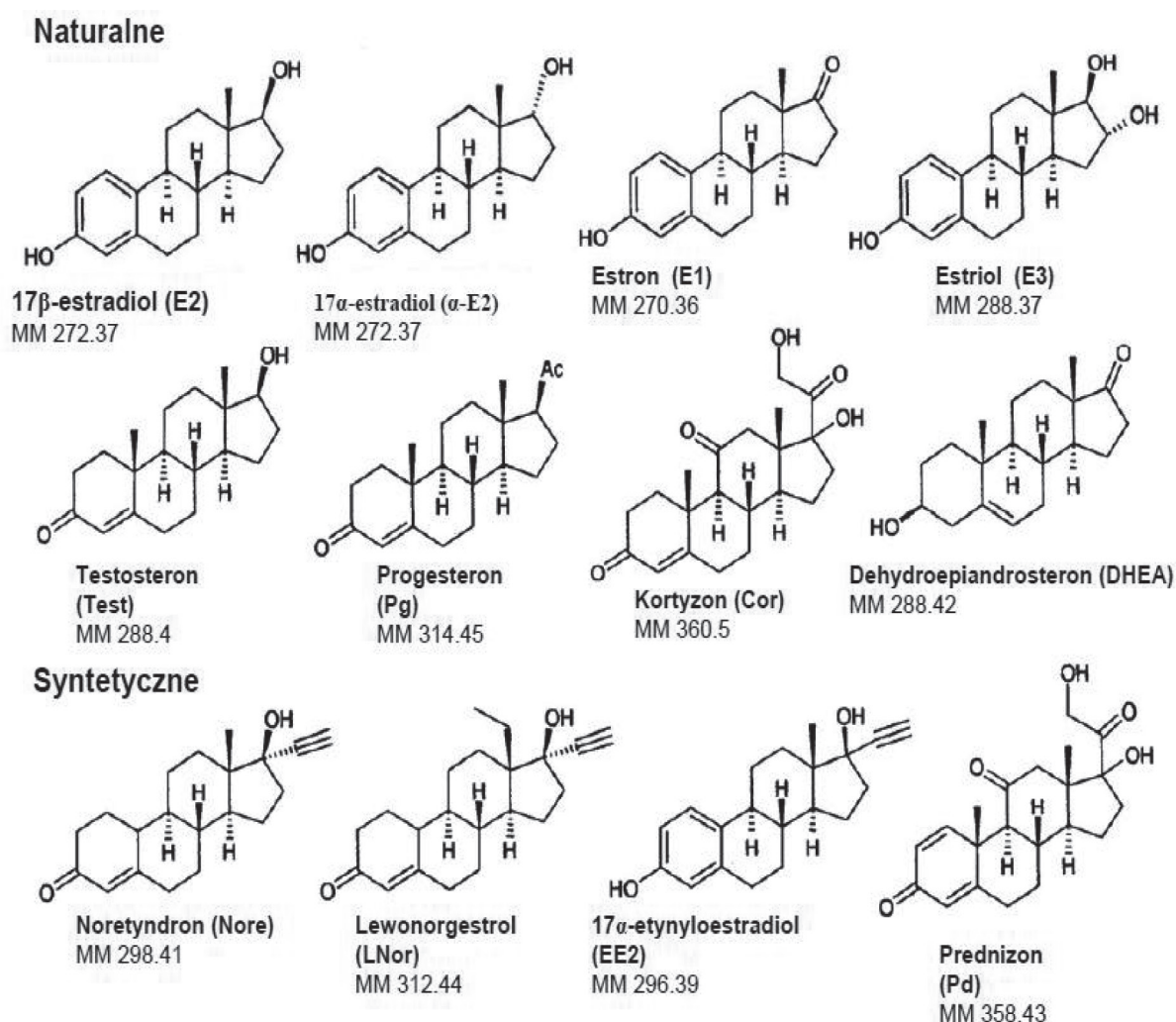
resweratrol), mykoestrogeny (zearalenon), metaloestrogeny, środki farmaceutyczne lub terapeutyczne, niektóre pestycydy (DDT), chemikalia przemysłowe, detergenty oraz inne syntetyczne związki (4-nonylfenol (NP), 4-oktylfenol (OP), bisfenol A (BPA), kamfora, 4-metylobenzylidenokamfora (4-MBC)). Liczba związków zaliczanych do EDCs waha się od kilkudziesięciu (najbardziej rygorystyczne podejście) do nawet kilkuset. Można dokonać prostego, choć nieco sztucznego, podziału ksenoestrogenów na fitoestrogeny, metaloestrogeny, pestycydy i związki syntetyczne. Wszystkie one wykazują aktywność estrogenową (ANAS i współaut. 2005, CAMPBELL i współaut. 2006).

Hormony regulują ważne procesy biologiczne w tym rozwój płciowy. Obecność związków estrogennych w ściekach jest międzynarodowym problemem z powodu potencjalnych skutków i zagrożeń dla przyrody i ludzi. EDCs są to syntetyczne hormony (np. ethynylestradiol zawarty w pigułkach antykoncepcyjnych) i hormony naturalne (np. estrogen i testosteron). Niektóre EDCs znajdują się w powszechnie używanych produktach, takich jak środki higieny osobistej (mydła, kosmetyki), uboczne produkty przemysłowe, tworzywa sztuczne (ftalany) i pestycydy. Wzrost liczby ludności, urbanizacja, rozwój przemysłu i związane z nimi zmiany w go-

*Temat realizowany w ramach projektu statutowego S/WBiIŚ/3/2011.

spodarcze rolnej znacząco przyczyniły się do wzrostu stężeń tych związków w wodach na-

turalnych i ściekach (TURNER i SHARPE 1997, FALCONER i współaut. 2006).



Ryc. 1. Struktury chemiczne wybranych EDCs zawierające w swojej budowie układ steranu (czyli steroidy i ich syntetyczne pochodne) (wg ANASA i współaut. 2005, zmieniona).

EDCs NAJCZĘŚCIEJ WYSTĘPUJĄCE W ŻYWNOSCI, W WODZIE ORAZ ICH ŹRÓDŁA

Związki powodujące zaburzenia endokrynologiczne, to różnego rodzaju substancje chemiczne pochodzące z przemysłu, rolnictwa i procesów technologicznych. Zawierają one ftalany (stosowane w produkcji tworzyw sztucznych), alkilofenole (obecne w detergentach i środkach powierzchniowo czynnych), polichlorowane bifenyle (PCB; dawniej w urządzeniach elektrycznych), dioksyny (uwalniane ze spalarni), pestycydy chloroorganiczne i organohalogeny (stosowane jako środki zmniejszające

palność). Związki te mają szeroki zakres struktur chemicznych, ale wszystkie z nich są w stanie zakłócić gospodarkę hormonalną organizmu.

Do tej pory najlepiej poznaną grupą EDCs są fitoestrogeny. Są to polifenolowe związki izolowane z roślin. Ich budowa przypomina strukturę 17-β-estradiolu, a klasyfikacja oparta jest na elementach struktury chemicznej charakterystycznych dla danej grupy. Do najlepiej poznanych klas polifenoli wykazujących działanie kseno-

estrogenowe należą: izoflawony (genisteina, daidzeina, biochanina A), lignany (enterolakton, enterodiol), kumestany (kumestrol), stilbeny (resweratrol) (LIMER i SPEIRS 2004). Fitoestrogeny występują w różnych gatunkach roślin. Nasiona soi zawierają izoflawony (genisteina, daidzeina, biochanina A, formononetyna, equol-metabolit daidzeiny), a kiełki soi kumestany (USUI 2006). Kumestany można znaleźć też w kiełkach nasion mango oraz w lucernie polnej (WOBER i współaut. 2002). Stilbeny występują w orzeszkach i czerwonym winie (LIMER i SPEIRS 2004), a dokładnie: 8-izoprenylnaryngenina i resweratrol w winogronach, a 8-prenylnaryngenina w chmielu (USUI

2006) oraz chińskiej roślinie *Anaxagorea luzonensis* (WOBER i współaut. 2002), natomiast ginsenoid Rg1 można znaleźć w żeńszenu (*Panax notoginseng*), a naryngeninę w grejfrutach (*Citrus grandis*) (USUI 2006). W liściach zielonej herbaty znajduje się epigallokatechina. Lignany zawarte są głównie w nasionach lnu oraz w większości owoców i warzyw. Szczególnym związkiem należącym do fitoestrogenów jest mykotoksyna – zearalenon (ZEA). ZEA to niesteroïdowa mykotoksyna produkowana przez niektóre grzyby z gatunku *Fusarium* spp. Stanowi ona zanieczyszczenie chleba i różnego rodzaju zbóż: kukurydzy, jęczmienia, pszenicy, ryżu, sorgo (LIMER i SPEIRS 2004).

KSENOESTROGENY STOSOWANE W PRZEMYŚLE

Do związków o działaniu słabych estrogenów należą przede wszystkim organochloryny (wśród nich fenole): nonylfenol, bisfenol A, oktylfenol (TOYAMA i współaut. 2004, ANAS i współaut. 2005) oraz ich pochodne. Są one często stosowane w przemyśle, głównie do tworzenia związków bardziej złożonych, które wchodzi w skład farb, lakierów, substancji pokrywających wewnątrz m.in. puszki z żywnością, wiele rodzajów plastików, a także wykorzystywane są w produkcji środków kosmetycznych, perfum, dezodorantów, szamponów (TURNER i SHARPE 1997, ANDERSSON i SKAKKEBAEK 1999, SHARPE i IRVINE 2001).

Opisuje się już setki zastosowań dla tych związków, a rozwój przemysłu wciąż dostarcza nowych sposobów na ich wykorzystanie. Organochloryny długo utrzymują się w środowisku i ulegają kumulacji w tkance tłuszczowej, co zwiększa potencjał i czas ich działania na organizm. Wykazano ich obecność w łańcuchach troficznych wielu biocenoz, również w populacjach ludzkich, np. u Eskimosów, których podstawą egzystencji jest łowiectwo i rybołówstwo. Organochloryny stwierdzono w mięsie ryb i fok (ANAS i współaut. 2005).

KSENOESTROGENY STOSOWANE W ROLNICTWIE

Ksenoestrogeny stosowane w rolnictwie to w większości pestycydy. Szczególnie dobrze udokumentowane jest działanie DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorofenyl)etan] i jego metabolitu DDE [1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorofenyl)etylen]. Środek ten był szeroko stosowany od lat 40. XX w. w rolnictwie, w leśnictwie, a także do użytku domowego. Mimo iż zakazano jego używania już w latach 70., w krajach tropikalnych jest on nadal używany, a resztki tego środka nadal krążą w środowisku, stwarzając tym samym realne zagrożenie (RHOUMA i współaut. 2001, ROBERTSON i współaut. 2002). Udowodniono, iż

DDT wykazuje właściwości estrogenowe, natomiast jego metabolit DDE właściwości anty-androgenowe. Ekspozycja na ten związek powodowała m.in. feminizację zwierząt laboratoryjnych (TOPPARI i współaut. 2002). Opisano także wiele przypadków nieprawidłowości u dziko żyjących zwierząt po ekspozycji na DDT, m.in. zaburzenia rozwoju piskląt ptaków oraz feminizację lub obojnactwo ryb żyjących w wodach skażonych resztkami pestycydów. Wskazuje to, że związki te nadal krążą w łańcuchach pokarmowych (ARAVINDAKSHAN i współaut. 2004, ANAS i współaut. 2005).

LEKI

Dobrze zbadaną grupę ksenoestrogenów stanowią leki. Najbardziej znanym jest diethylstilbestrol (DES). Odkryty w 1938 r. syntetyczny estrogen był tani w produkcji, stabilny i aktywny po doustnym podaniu. W medycynie stosowano go w ramach hormonalnej terapii zastępczej, hamowania laktacji, antykoncepcji, podtrzymaniu ciąży, terapii raka prostaty. W hodowli podawany był do stymulacji wzrostu bydła. Jest odporny na rozkład i ulega akumulacji (GIUSTI i współaut. 1995). Mimo iż badania kliniczne przeprowadzone w latach 50. ubiegłego wieku wykazały, iż DES jest nieskuteczny w podtrzymywaniu ciąży, stosowano go nadal aż do wczesnych lat 70. Podaje się, iż ok. 5.10 miliona mieszkańców Stanów Zjednoczonych Ameryki w różnym okresie życia postnatalnego było ekspozowanych na działanie DES (matki DES) lub było ekspozowanych na ten środek w okresie prenatalnym (dzieci DES) (GIUSTI i współaut. 1995). Bogata dokumentacja badań kobiet i ich nowonarodzonych dzieci ukazuje działanie leku na płód. U synów kobiet stosujących DES w czasie ciąży zaobserwowano wiele nieprawidłowości dotyczących układu płciowego. Najczęstsze z nich to: cysty najądrza, spodiectwo, hiperplazja jąder (ATANASSOWA i współaut. 1999, GOYAL i współaut. 2003). Doniesienia na temat zmian ilościowych i jakościowych plemników u mężczyzn (synów DES) są sprzeczne, co związane jest przypuszczalnie z niemożliwością ustalenia, czy matki nie zażywały także innych leków.

Nieprawidłowości układu płciowego obserwowano także u córek matek stosujących DES w czasie ciąży (GIUSTI i współaut. 1995). Oprócz tego istnieją dane dotyczące zmian w układzie immunologicznym zwierząt laboratoryjnych. Najczęstsze z nich to atrofia śledziony i grasicy oraz spadek populacji limfocytów Th. W badaniach populacji ludzkiej narażonej na DES nie zaobserwowano podobnych zmian, lecz można spodziewać się zwiększonej liczby zachorowań na choroby autoimmunologiczne w wieku późniejszym (GIUSTI i współaut. 1995).

Kolejnym źródłem ksenoestrogenów mogą być metabolity leków stosowanych w doustnej terapii antykoncepcyjnej kobiet, które wraz ze ściekami komunalnymi mogą przedostawać się do wód. Obecnie stosowane preparaty antykoncepcyjne zawierają, co prawda niewielkie ilości E2 (17- β -estradiol) i progesteronu, lecz preparaty starszych generacji zawierały dość znaczne ilości tych hormonów. To właśnie resztki tych preparatów, krążące jeszcze w środowisku, mogą stanowić zagrożenie jako związki czynne hormonalnie. W piśmiennictwie znaleźć można wiele publikacji dotyczących zawartości związków czynnych hormonalnie w ściekach komunalnych, a także pochodzących z farm hodowlanych oraz ich wpływu na biocenozy wodne. W tej sytuacji istnieje realne zagrożenie przedostania się tych substancji do wód gruntowych, a z nimi do wody pitnej (SOTO i współaut. 2004, BRIAN i współaut. 2005).

FITOESTROGENY ZAWARTE W ŻYWNOSCI

Kolejną kategorią ksenoestrogenów są estrogeny pochodzące z żywności. Do tej grupy zaliczamy substancje zawarte w mięsie, o działaniu słabych estrogenów, resztki pestycydów na owocach i warzywach, a także tworzywa używane do pakowania żywności oraz produkty zawierające grzyby (mykoestrogeny) (MURKIES i współaut. 1998, ANDERSSON i SKAKKEBAEK 1999). Największą grupę ksenoestrogenów pochodzących z żywności stanowią jednakże związki naturalnie występujące w roślinach, fitoestrogeny, które mogą naśladować działanie 17- β -estradiolu. Już w latach 20. ubiegłego wieku opisywano pierwsze rośliny, których składniki wykazywały działanie podobne do estrogenów. Pochodne tych

estrogenów zidentyfikowano w moczu człowieka w 1982 r. (MURKIES i współaut. 1998).

Występują 3 główne grupy fitoestrogenów: izoflawony, kumestany i lignany. Wszystkie te związki obecne są w roślinach lub nasionach roślin (SETCHELL 2001, KURZER 2003). Związki te nie ulegają biokumulacji w tkankach organizmu, a ich potencjał hormonalny jest różny (LEFFERS i współaut. 2001, MORITO i współaut. 2002, WITORCH 2002). Z przeprowadzonych badań wynika, iż jest on o kilka rzędów wielkości niższy niż 17- β -estradiolu, jednakże przy stałej lub długotrwałej ekspozycji wpływ tych związków na zdrowie nie może być lekceważony. U osób ekspozowanych na podwyższone dawki

fitoestrogenów, ich stężenie może osiągnąć wartość nawet 20 tysięcy razy wyższą niż endogennych estrogenów (SETCHELL 2001).

Działanie ksenoestrogenów polega przede wszystkim na interakcji z receptorem estrogenowym. Przyłączenie izoflawonów do ER (ang. estrogen receptor) jest możliwe, gdyż w przewodzie pokarmowym, w wyniku działania flory bakteryjnej, dochodzi do zmiany konformacji, stąd związek swoją budową przypomina estrogeny (pasuje do domeny receptorowej wiążącej ligand). Tak zmienne izoflawony przedostają się do naczyń krwionośnych, gdzie mogą osiągnąć stężenie kilkakrotnie wyższe niż endogenne estrogeny. Część fitohormonów ulega glukuronizacji w wątrobie i jest eliminowana z organizmu m.in. z moczem (ROSSELLI i współaut. 2000, SETCHELL 2001).

ALMSTRUP i współaut. (2002) wykazali, iż związki te mogą wpływać na komórki drogą inną niż przyłączanie do ER. Opisałi oni działanie izoflawonów na aromatazę cytochromu P450, enzymu odpowiedzialnego za konwersję androgenów do estrogenów. Reakcja aromatyzacji testosteronu odpowiada za produkcję estrogenów w tkankach innych niż gruczoły płciowe i jest głównym szlakiem wytwarzania estrogenów u mężczyzn i kobiet po menopauzie. Fitoestrogeny w śladowych ilościach hamowały aktywność enzymu (działały jak antyestrogeny), natomiast w dużych stężeniach działały jak typowe estrogeny (ALMSTRUP i współaut. 2002).

Inną hipotezą tłumaczącą działanie fitoestrogenów jest zaburzenie aktywności enzymów biorących udział w syntezie hormonów steroidowych (SHARPE 2001, GREIM 2004). Pojawiły się także doniesienia, mówiące iż część efektów obserwowanych w populacjach nie jest skutkiem estrogenowego działania ksenoestrogenów, ale wynika z ich działania, jako słabych anty-androgenów, blokujących powstawanie testosteronu (ALMSTRUP i współaut. 2002).

Dostępna wiedza na temat ksenoestrogenów, a w szczególności izoflawonów skłoniła wielu autorów do wysunięcia tezy, iż opisywane nieprawidłowości dotyczące zaburzeń funkcji rozrodczych związane są ze spożyciem izoflawonów (LEFFERS i współaut. 2001, JOFFE 2002).

Przeprowadzono wiele badań epidemiologicznych i klinicznych, także na modelach zwierzęcych, ukazujących wpływ izoflawonów na liczbę plemników. Uzyskane dane są sprzeczne albo wskazują na brak powiązań

między spożyciem izoflawonów a liczbą plemników. Zaobserwowano także spadek poziomu testosteronu po ekspozycji na izoflawony (WEBER i współaut. 2001, ROBERTSON i współaut. 2002). Oprócz tego, opisano zwiększony odsetek zachorowań na nowotwory jąder, przypuszczalnie jako efekt ekspozycji na ksenoestrogeny (JOFFE 2002, TOPPARI i współaut. 2002). Zauważono natomiast hamujący wpływ izoflawonów na proliferację komórek raka prostaty (ROCHIRA i współaut. 2005).

Znacznie poważniejsze konsekwencje pociąga za sobą ekspozycja na fitoestrogeny płodów płci męskiej w okresie prenatalnym. Obserwacje McLachlana ukazują, iż substancje o słabym działaniu estrogenowym w okresie prenatalnym mogą powodować nieprawidłowości rozwojowe narządów płciowych, takie jak: niezstąpienie jąder, cysty jądra, pozostałości przewodów Müllera. Dodatkowo mogą wystąpić poważne zmiany w samej gonadzie: przeprogramowanie funkcji komórek Sertoliego i Leydiga, spadek wagi jąder i ilości komórek plemnikotwórczych, zmiany w kanalikach nasiennych, a także podwyższona ilość komórek germinalnych apoptotycznych (MCLACHLAN 2001). Zmiany te występują z różnym nasileniem w zależności od dawki i czasu ekspozycji (ATANASSOWA i współaut. 1999).

Jednakże fitoestrogeny to nie tylko zaburzenia funkcji płciowych. Opublikowano szereg prac ukazujących korzystny wpływ fitoestrogenów na organizm ludzki. Pozytywne działanie tych substancji związane jest przede wszystkim z ich właściwościami antyoksydacyjnymi, obniżaniem poziomu cholesterolu, hamowaniem powstawania zakrzepów i zwiększeniem elastyczności naczyń oraz hamowaniem angiogenezy. To ostatnie zjawisko jest korzystne w przebiegu leczenia nowotworów (WEBER i współaut. 2001, GREIM 2004).

W piśmiennictwie można znaleźć wiele artykułów opisujących działanie protekcyjne izoflawonów, które zaobserwowano u kobiet: przeciwdziałanie osteoporozie i zmniejszenie ryzyka raka piersi (MURKIES i współaut. 1998, GREIM 2004). Produkty pochodzenia sojowego znalazły także zastosowanie w hormonalnej terapii zastępczej. Udowodniono, że redukują częstotliwość uderzeń gorąca i innych symptomów klimakterium (GARDINER i RAMBERG 2001, CASSIDY 2003). Na terenie Stanów Zjednoczonych rynek suplementów, zawierających związki estrogenowe pochodze-

nia roślinnego, szacuje się na 100 milionów dolarów rocznie (KURZER 2003).

Oprócz kobiet, spożywających znaczne ilości soi, niezależnie czy to w postaci gotowych suplementów, czy wskutek zmiany diety na wegetariańską, duże ilości potencjalnie estrogenowych substancji spożywają dzieci w okresach największej wrażliwości. Dotyczy to przede wszystkim odżywek dla niemowląt z nietolerancją białek zwierzęcych, a także dzieci karmionych piersią, których matki spożywają znaczne ilości fitoestrogenów w diecie. Istnieją eksperymenty na modelach zwierzęcych mówiące o niekorzystnym wpływie matczynego poziomu ksenoestrogenów na karmione niemowlę (WIŚNIEWSKI i współaut. 2003, ARAVINDAKSHAN i współaut. 2004).

Na rynku dostępnych jest wiele preparatów spożywczych, zawierających domieszki protein i innych substancji pochodzenia sojowego, przeznaczonych dla niemowląt. Szacuje się, iż w Stanach Zjednoczonych ok. 36% dzieci (ok. 1,4 mln) rocznie spożywa odżywkę przez różny okres, do ukończenia pierwszego roku życia (MERRITT i JENKS 2004). Podaje się, że u dzieci spożywających odżywkę na bazie izoflawonów obserwuje się ok. 1000 razy wyższe stężenie estrogenów niż u

ich rówieśników karmionych mlekiem matek stosujących dietę sojową (SUMPTER 2005). Oznacza to, że przekazywanie izoflawonów z mlekiem matki stanowi mniejsze ryzyko niż podawanie ich w odżywkach. Ponadto, stężenie izoflawonów w osoczu niemowląt karmionych odżywkami było 13–22 tysięcy razy wyższe niż estradiolu. Nie opisano jednak żadnych objawów klinicznych tego zjawiska (MERRITT i JENKS 2004), gdyż uznano, że brak objawów wiąże się z nieprzyswajalnością tych związków w układzie pokarmowym niemowlęcia. IRVINE i współaut. (1998) obalili jednak tę tezę. W przeprowadzonym eksperymencie badali ilość wydalanych z moczem izoflawonów, pochodzących z odżywek. Wyniki ich badań wskazują, że dzieci od 4-tego miesiąca życia są w stanie trawić i przyswajać izoflawony na poziomie podobnym jak osoby dorosłe. Mimo że nie ma przekonujących dowodów wpływu tej wczesnej ekspozycji na późniejszy rozwój dzieci, to biorąc pod uwagę, iż okres niemowlęctwa jest okresem podwyższonej wrażliwości na estrogeny, możliwości wystąpienia zmian w okresie dojrzalym należy uznać za prawdopodobne (IRVINE i współaut. 1998).

METODY WYKRYWANIA I MONITORINGU EDCs

Jest wiele dróg wykrywania związków zakłócających procesy hormonalne. Tradycyjne metody analityczne, takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (LC-MS), chromatografia gazowa (GC) czy też chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC-MS), są szeroko używane do pomiarów ilościowych związków zakłócających gospodarkę hormonalną (TERNES i współaut. 1999, PETROVIC i BARCELO 2000, KOLPIN i współaut. 2004).

Jednakże nadrzędnym celem jest ocena ryzyka środowiskowego wywołanego przez te związki, poprzez określenie ich potencjału zakłócania równowagi hormonalnej i z wielu powodów wyżej wymienione tradycyjne metody nie wystarczają do takiej oceny. Pierwszym ograniczeniem jest to, że analit musi być znany, aby mógł zostać ilościowo oznaczony poprzez te metody. Tysiące związków zakłócających procesy hormonalne, pozostają nadal niezidentyfikowane. Wystarczy, żeby badana próbka zawierała jeden lub kilka do-

tychczas niezidentyfikowanych związków, aby nie można było uzyskać kompletnych informacji o właściwościach chemicznych badanych substancji, w tym ich potencjalnych możliwościach zakłócania równowagi hormonalnej. Po drugie, tradycyjne metody nie dostarczą danych, które pozwolą ocenić wielkość wpływu badanych substancji na środowisko. Nawet jeśli badany związek zostanie zidentyfikowany jako zakłócający procesy hormonalne, to i tak podstawowa analiza chemiczna, na przykład metodą chromatografii, nie pozwoli na określenie wpływu badanego związku na środowisko naturalne. Dodatkowo, w jednej próbce mogą być związki, które między sobą wykazują efekty synergii i antagonizmu (BJÖRKBLOM i współaut. 2008).

W celu zrekompensowania problemów wynikających z używania tradycyjnych technik analitycznych, rozwinięto techniki testów biologicznych, które pozwalają na lepszy wgląd w potencjał zakłócania równowagi hormonalnej danej próbki. Możliwe są również testy mierzące wpływ tych związków

na cały organizm ryb, płazów, ptaków owadów czy innych zwierząt. Pomiar zaburzeń endokrynologicznych u płazów, ryb, ptaków i owadów może być potencjalnym podejściem do monitorowania zanieczyszczeń związanych z EDCs w środowisku wodnym. Populacja żab wydaje się być szczególnie wrażliwa na działanie EDCs. Zaburzenia gonad obserwowano u 10-92% samców żab zbadanych w całych Stanach Zjednoczonych. Wiele testów estrogenowych, opartych na badaniu ryb, zostało opracowanych przez np. US EPA przy użyciu żywych organizmów, głównie *Oncorhynchus mykiss* i *Danio rerio*. Istnieją różne podejścia do ustalenia estrogennej odpowiedzi w tych organizmach, w tym zniekształcenia, braki reprodukcyjne jaj i zaburzenia w rozwoju potomstwa, a także produkcję białka w surowicy (YAMADA 2008).

Monitoring EDCs z użyciem żywych organizmów ma tę zaletę, że możemy ocenić prawdziwy wpływ estrogenów na dane gatunki. Ponadto, zamieszkują one różne środowiska i mogą służyć jako biologiczne wskaźniki obszarów szczególnie narażonych na wpływ EDCs. Główną wadą tej metody jest brak specyficzności reakcji organizmu na różnego rodzaju EDCs. Często jednak związki zakłócające procesy hormonalne wpływają różnie na różne gatunki zwierząt, stąd testowanie wszystkich tych związków w różnych kombinacjach i stężeniach, spotykanych w środowisku, przez wszystkie zwierzęta jest nierealne.

Biotesty komórkowe są alternatywą dla tradycyjnych technik analitycznych i testów przeprowadzanych na całych organizmach. Biotesty te przeważnie wykorzystują drożdże lub komórki ludzkie (takie jak na przykład komórki raka piersi lub nerki) w celu określenia zakresu zakłóceń procesów hormonalnych (VAN DEN BELT i współaut. 2004). Komórki są wykorzystywane w sposób niezmienny lub po bioinżynieryjnych modyfikacjach tak, by dać pożądaną odpowiedź na dany związek zakłócający gospodarkę hormonalną (PANICKER i współaut. 2006). Na przykład do komórek drożdży, które nie mają naturalnych receptorów estrogenu, może zostać wprowadzony taki receptor z genomu ludzkiego, ryb czy innych gatunków. Raz wbudowane receptory będą przyczyniać się do ekspresji mierzonych protein, takich jak lucyferaza czy β -galaktozydaza, które mogą być monitorowane kolorymetrycznie lub luminescencyjnie (ROUTLEDGE i SUMPTER 1997, WEYER i RILEY 2001).

Zaletą tego typu testów jest to, iż różne związki, w rozmaitych proporcjach mogą być testowane relatywnie niedrogo. Jednym z najczęściej wykorzystywanych testów jest test aktywności estrogennej z użyciem drożdży (ang. yeast estrogen screen, YES) opisany przez ROUTLEDGE i SUMPTER w 1997 r. (DESBROW i współaut. 1998, KIM i współaut. 2004, FERNANDEZ i współaut. 2007). Otrzymane wyniki są znormalizowane w stosunku do najpowszechniejszego, naturalnego estrogenu E2 używanego jako standard (ROUTLEDGE i SUMPTER 1997, KATASE i współaut. 2008).

Testowanie aktywności estrogennej w próbkach środowiskowych związane jest często z oceną wpływu człowieka na środowisko. Ważnym miejscem monitorowania potencjalnie szkodliwych substancji są oczyszczalnie ścieków. Podczas oceny efektywności usuwania szkodliwych związków ze ścieków w oczyszczalni ścieków, zakłada się, że jeżeli nie można oznaczyć danego związku, to znaczy, że został on pomyślnie usunięty i odpływ z oczyszczalni ścieków jest bezpieczny. Jednakże należy pamiętać, że związki mogły się rozłożyć lub przetransformować w inny związek, który nie podlega badaniom kontrolnym. Przeprowadzone badania pokazały, że niektóre produkty rozkładu lub transformacji mogą być bardziej szkodliwe niż związek macierzysty. Tak jest w przypadku metoksychloru (metylo-DDT), który, tracąc grupy metylowe, staje się bardziej estrogenny dla ryb (RANKOUHI i współaut. 2002, LATCH 2003). Dodatkowo, estrogeny, które w większości są wydalane przez człowieka w stanie związanym, są biologicznie nieczynne lub posiadają niewielką aktywność estrogenną (GOMES i współaut. 2005, NIETO i współaut. 2008), a w ściekach lub oczyszczalni ścieków mogą ulegać rozpadowi do wolnych, aktywnych estrogenów (D'ASCENZO i współaut. 2003).

Zatem wiedza na temat produktów rozkładu, które są uwalniane do środowiska jest istotna dla zrozumienia rozmiaru zakłócenia hormonalnego. Tak jest w przypadku EE2, który przyjmowany przez kobiety w środkach antykoncepcyjnych jest wydalany w 50-90% z moczem jako glukoronid w pozycji C3. Reszta EE2 jest usuwana z organizmu głównie jako 3-sulfonianetylenoestradiolu (EE2-3S) (GOMES i współaut. 2005, GABET i współaut. 2007), który w drodze do oczyszczalni (lub w samej oczyszczalni) ulega rozpadowi do wolnego EE2. Oszacowano, że 99% aktywności estrogennej w odpływach

z oczyszczalni oraz wodzie powierzchniowej pochodzi od E2 i EE2 (KOH i współaut. 2007).

Biotesty bezkomórkowe, w których do przeprowadzenia badania nie wymaga się całych komórek, pozwalają uniknąć pewnych trudności związanych z przepuszczalnością błony komórkowej, czynnością komórek, stadiami rozwoju organizmu, a w konsekwencji, odpowiedzią toksyczności dla danej próbki. Niektóre z analiz ilościowych, takie jak test immunoenzymatyczny (ELISA) i test enzymu związanego z receptorem (ELRA), wymagają systemów laboratoryjnych i wskaźników, ale zapewniają dokładny pomiar stężenia EDCs. ELISA jest aktualnie dostępna dla wielu istotnych dla środowiska związków powierzchniowo czynnych, estrogenów, a tak-

że pestycydów, antybiotyków i innych produktów higieny osobistej. Zarówno ELISA i ELRA zostały z powodzeniem zastosowane do próbek środowiskowych, a także przyczyniły się do rozwoju biosensorów z wykorzystaniem systemu Biacore. Duża część badań prowadzonych w analityce środowiskowej jest skupiona na wykrywaniu i oznaczaniu związków macierzystych, podczas gdy analiza metabolitów i produktów transformacji należy do rzadkości. Eliminacja farmaceutyków (szczególnie polarnych) podczas oczyszczania wody w stacjach uzdatniania czy oczyszczalniach jest niesatysfakcjonująca, dlatego konieczne jest przeprowadzenie większej ilości badań, by ustalić ich drogi rozkładu oraz ocenić los produktów transformacji (CAMPBELL i współaut. 2006).

WPLYW EDCs NA ORGANIZMY ŻYWE

Najwięcej informacji o wpływie zanieczyszczeń wody na gospodarkę hormonalną dostarczają badania na dzikich zwierzętach (SUMPTER 2005). Zanieczyszczenia przyczyniają się do obniżenia płodności u niektórych gatunków ryb (BORTONE i DAVIS 1994), męskulinizacji samic ryb (DENTON i współaut. 1985) czy feminizacji samców ryb (GIMENO i współaut. 1998a, b; BATTY i LIM 1999). Na problemy ryb w okresie rozrodczym wpływają produkty rozkładu powierzchniowo czynnych substancji stosowanych w przemyśle i dla potrzeb domowych (JOBLING i współaut. 1996). Wśród związków chemicznych, stosowanych obecnie w rolnictwie, destrukcyjnie na gospodarkę hormonalną działają m. in. pestycydy czy środki grzybobójcze (FITZMAYER i współaut. 1982). Herbicydy wpływają na reprodukcję i wzrost guza piersi u gryzoni i na reprodukcję ryb. Ksenobiotyki mogą zaburzać gospodarkę hormonalną przez wpływ na hormony endogenne. Fenitroton, ketokonazol mogą wpływać na ssaki poprzez hamowanie kluczowych enzymów biorących udział w syntezie androgenów. Uważa się, że pestycydy chloroorganiczne, wykorzystane w walce ze szkodnikami, wpływają na estrogeny, co wykazano w badaniu na myszach. W tym przypadku skażenie wody pitnej jest traktowane jako potencjalne zagrożenie dla zdrowia. US EPA informuje, że woda zawierająca więcej niż 0,05 mg/L związku macierzystego lub 0,2 mg/L metabolitu nie może być dopuszczona do spożycia zarówno przez

dzieci, jak i dorosłych. Narażenie człowieka na alkilofenole (AP) lub alkilofenole oksyetylenowane (APE) może nastąpić poprzez picie wody z zanieczyszczonego źródła. Brak jest jednak jednoznacznych dowodów, że AP lub APE mogą niekorzystnie wpłynąć na zdrowie człowieka. Istnieją doniesienia o alkilofenolach wpływających na opóźnianie dojrzewania, jak również powodujących uszkodzenie jąder u młodych szczurów (JOBLING i współaut. 1996, NIMROD i BENSON 1998).

Fitoestrogeny znajdują obecnie coraz szersze zastosowanie w terapii oraz jako suplementy diety człowieka. Dotychczas określono ich pozytywny wpływ na masę i uwapnienie kości, szczególnie u kobiet w wieku postmenopauzalnym. Fitoestrogeny hamują wzrost nowotworów piersi (daidzeina, genisteina, resweratrol – jako antyoksydanty) i jednocześnie indukują w nich procesy różnicowania lub apoptozy (resweratrol). Suplementacja diety jest polecana kobietom w okresie menopauzy, ponieważ związki te łagodzą jej objawy. Uważa się, że efektem działania tych związków może być też zmniejszenie ryzyka występowania demencji, głównie choroby Alzheimera oraz usprawnienie procesów uczenia się i zapamiętywania. Wiele wyników badań, w tym badań epidemiologicznych prowadzonych w różnych społecznościach, wydaje się wspierać teorię, że fitoestrogeny obniżają ryzyko miażdżycy tętnic oraz choroby niedokrwiennej serca (USUI 2006). Resweratrol zmniejsza ryzyko chorób układu

krwionośnego poprzez hamowanie procesu utleniania cholesterolu LDL, procesu agregacji płytek krwi oraz syntezy eikozanoidów. Blokują też ekspresję czynników biorących udział w procesie krzepnięcia krwi (KRIS-ETHERTON i współaut. 2002).

Wielu badaczy potwierdza pozytywne działanie ksenoestrogenów na poziom cholesterolu LDL, apolipoproteiny B-100 oraz triacylogliceroli (TAG). Działają one korzystnie na kości, metabolizm glukozy i lipidów, łagodzą dolegliwości menopauzalne, hamują wzrost nowotworów piersi, spowalniają rozwój chorób mózgu i układu krwionośnego (WOBER i współaut. 2002, USUI 2006). Jednakże należy podkreślić, że wpływ i mechanizm działania tych związków na diabetyków, chorujących na cukrzycę typu 2, oraz na osoby z nadwagą są jeszcze niejasne (USUI 2006). Wykazują one także działanie przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe (resweratrol) (AGGARWAL i współaut. 2004).

Nie wszystkie fitoestrogeny wykazują korzystne działanie estrogenowe. Pochodne zearalenonu wywołują szereg niekorzystnych zmian. Zaburzają płodność u zwierząt, zwiększają ryzyko śmierci płodu, zmniejszają masę nadnerczy i przysadki mózgowej (MINERVINI i współaut. 2005).

Ostatnie badania sugerują, iż metale reprezentują nową klasę związków zakłócających działanie estrogenowe (EDC-s). Receptor estrogenowy stanowi białko wiążące metal – cynk. Przyłączenie cynku do reszt cysteinowych domeny wiążącej DNA prowadzi do utworzenia motywu tak zwanych palców cynkowych. Dotychczasowe badania ukazują, że metal ten może zostać zastąpiony innym metalem (np. nikiel, miedź), co powoduje zakłócenie zdolności wiązania domeny wiążącej DNA i wytworzenia pożądaných struktur, np. palców cynkowych (MARTIN i współaut. 2003).

Do tej pory do metaloestrogenów zaliczono między innymi kadm (Cd), miedź (Cu), kobalt (Co), nikiel (Ni), ołów (Pb), rtęć (Hg), cynę (Sn), chrom (Cr) oraz anion wanadowy i arseniany. Powszechnie znany jest fakt, że współczesna ludzka populacja, a zwłaszcza osoby żyjące w zurbanizowanym środowisku, narażona jest na znaczną ekspozycję na metale ciężkie. Można je znaleźć w wodzie, glebie (Cr, Hg, Cu – 1–800 µg/litr oraz 40–459 mg/kg), w rybach (Ni, Cr, Hg, Pb, Cu – 81–328 mg/g), w zbożach (Cu – 1–14 µg/g), w powietrzu i dymie papierosowym (Cd w nerkach u niepalących – 15–20 µg/g, u pala-

czy – 30–40 µg/g) (STOICA i współaut. 2000, MARTIN i współaut. 2003).

Zdolność wiązania metali z ER α sugeruje, że metale te mogą zwiększać ryzyko zaburzeń w układzie endokrynnym. Długa ekspozycja kobiet na ołów i rtęć może prowadzić do niepłodności, poronienia, nadciśnienia indukowanego ciążą, przedwczesnego porodu oraz zaburzeń cyklu miesięczkowego. Eksperymenty na zwierzętach wykazały, że metale mogą powodować zahamowanie menstruacji, owulacji, dojrzewania komórek jajowych oraz zmniejszenie możliwości zajścia w ciążę. Wzrost ilości estrogenów u kobiet w ciąży jest powiązany ze zwiększonym poziomem miedzi krążącej we krwi. Według ostatnich badań Ni, Co, Hg, Pb, Cr⁺⁶ mogą indukować proces rozwoju nowotworu piersi, nerek, płuc, wątroby i trzustki (MARTIN i współaut. 2003). Arsen również inicjuje proces kancerogenezy, indukuje morfologiczną transformację, wymianę chromatyd siostrzanych, chromosomalne modyfikacje, amplifikacje genów, co prowadzi do różnego typu mutacji. Metal ten modyfikuje też aktywność enzymów naprawiających DNA oraz zakłóca replikację poprzez interakcję As³⁺ z grupami tiolowymi (STOICA i współaut. 2000).

Do substancji znanych jako ksenoestrogeny zalicza się też pestycydy (środki szkodnikobójcze). Są to związki wykorzystywane do niszczenia pasożytów roślin i zwierząt, zwalczania ich chorób oraz usuwania chwastów. Według Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (US, EPA) „pestycyd to substancja lub mieszanina substancji wykazująca zdolność niszczenia, odstraszania lub hamowania rozwoju szkodników” (COSTA 1997).

Różne rodzaje pestycydów, takich, jak o,p'-DDT, metoksychlor, toksafen, dieldryna, endosulfan, fenarimol, primikarb (GRUNFELD i współaut. 2004), pochodne dioksyn, polichlorowane bifenylole (PCBs), imazalil, propiokonazol, triadimefon, triadimenol, prochloraz, metiokarb (HOFMEISTER i BONEFELD-JORGENSEN 2004), deltametryna, chloropyrifos (ANDERSEN i współaut. 2002), trans-nonachlor, chlordan, fenvalerat, karbaryl, pentachlorofenol, kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy, chlorodekon, endryna, aldryna (LEMAIRE i współaut. 2006), są klasyfikowane jako związki o potencjalnym działaniu endokrynnym. Można wśród nich wyróżnić insektycydy (i) polichlorowane (np. endosulfan, DDT, dieldryna), (ii) polichlorowane bifenylole (PCB), (iii) pyretroidy syntetyczne (deltametryna, sumitryna, fenvalerat), (iv) herbicydy (surflan, oryzalin)

(HALL i współaut. 2005) oraz (v) fungicydy (prochloraz, fenarimol) (AGGARWAL i współaut. 2004).

Wiele z nich wycofano lub ograniczono ich zastosowanie z powodu wysokiej uciążliwości dla środowiska oraz zdolności do kumulacji w żywych organizmach. Przykładem może być DDT. Zakaz jego stosowania w Polsce obowiązuje od 1973 r. (SEŃCZUK 2002).

Wykazano, że u mężczyzn pracujących przy opryskiwaniu roślin, DDT powodował zmniejszenie liczby plemników oraz prowadził do impotencji (WARING i HARRIS 2005). Związek ten należy do trucizn wieloukładowych i uszkadza różne narządy wewnętrzne (wątroba, nerki), a także działa ośrodkowo i obwodowo neurotoksycznie (SEŃCZUK 2002). DDT jest jeszcze używany w niektórych częściach świata do walki z owadami przenoszącymi malarię, dur brzuszny i gorączkę tropikalną - dengę (WOBER i współaut. 2002).

W ostatnich latach wykazano, że także niektóre związki syntetyczne lub ich metabolity wykazują podobne działanie do 17 β -estradiolu. Należą tu między innymi alkilofenole (NP., nonylfenol; OP, oktylfenol; BPA, bisfenol A; BAD, difenol A dimetyloakrylowy; TEGDMA, glikol trójetylodimetyloakrylowy), ftalany (DEHP), perfluoroalkiloalkohole (6:2 FTOH, 8:2 FTOH), parabeny, ester etylowy kwasu p-aminobenzoesowego (Et-PABA), 4-metylobenzylidenokamfora (4-MBC). Alkilofenole wprowadzono do użytku w latach czterdziestych. Można je znaleźć w farbách, herbicydach, pestycydach, niektórych niejonowych detergentach, kosmetykach oraz w plastikowych pojemnikach i materiałach kompozytowych. Nonylfenol (NP), oktylfenol (OP) oraz ich metabolity uwalniane są z tworzyw sztucznych i trafiają do wód powierzchniowych, gdzie mogą ulegać kumulacji (BLOM i współaut. 1998).

Difenol A [BPA; (2,2-bis-(4-hydroxyfenylo)propan] jest używany jako monomer do produkcji polimerów wielowęglowych i epoksy-polimerów żywic, występujących w pojemnikach na pożywienie i lakach dentystycznych. Związek ten odnaleziono jako zanieczyszczenie pożywienia przechowywanego w pojemnikach z dodatkiem BPA (WOBER i współaut. 2002). Niektóre materiały kompozytowe i laki szczerlinowe, stosowane w stomatologii, uwalniają w jamie ustnej BPA, BAD (difenol A dimetyloakrylowy) oraz TEGDMA (glikol trójetylodimetyloakrylowy).

Wykazano jednak, że związki te najprawdopodobniej nie przenikają do krwi, lecz

pozostają w ślinie jamy ustnej (FISHER 2004). Głównym przedstawicielem diestrów kwasu ftalanowego jest ftalan di-2-etyloheksylu (DEHP). Stosowany jest jako plastyfikator tworzyw sztucznych (np. polichloroku winylu, PCW), rozpuszczalnik żywic, klejów i lakierów (SEŃCZUK 2002). PCW może zawierać maksymalnie do 40% DEHP. Polichlorek winylu jest używany do wyrobu zabawek, zasłon prysznicowych, winylowych tapicerek, papieru, rękawiczek medycznych, pojemników na krew, rurek tracheotomijnych, drenów i dializatorów. DEHP przenika z plastików do wody i płynów biologicznych. Grupę najbardziej ekspozowaną na DEHP stanowią pacjenci poddawani transfuzji oraz hemodializie (BLOM i współaut. 1998). Wykazano też, że estry ftalanów mogą wpływać na transkrypcję wielu genów związanych z transportem cholesterolu oraz biosyntezą testosteronu (FISHER 2004).

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie fluorowanymi związkami stosowanymi w smarach, środkach przeciwkorozyjnych, insektycydach, kosmetykach i powłokach papierowych. Okazało się, że posiadają one atrakcyjne właściwości dla przemysłu elektronicznego, tekstylnego i tworzyw sztucznych. Jednakże dokładniejsze badania udowodniły także ich toksyczny charakter. Perfluoroalkiloalkohole są trudno biodegradowalne oraz mają negatywny wpływ na zdrowie człowieka. Zaburzenia układu endokrynnego, to tylko jeden z przykładów ich niekorzystnego działania. Długa ekspozycja na związki perfluoroalkilowe może prowadzić do zaburzeń układu rozrodczego, zmian behawioralnych (zaburzenia uczenia się) oraz do uszkodzenia tarczycy (MARAS i współaut. 2006).

Ksenoestrogeny można również znaleźć w kosmetykach, między innymi szamponach, kremach, mydłach oraz w niektórych środkach spożywczych i farmaceutycznych. Najczęściej dodaje się je jako konserwanty. Przykładem takich związków są tak zwane parabeny, czyli estry kwasu p-hydroksybenzoesowego: ester metylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego (Nipagina M, Aseptina M), ester etylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego (Nipagina A, Aseptina A), ester propylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego (Nipagina P, Aseptina P), ester butylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego. W wyniku stosowania kosmetyków z parabenami zarejestrowano wiele przypadków alergicznego zapalenia

skóry, wyprysków oraz zapalenia spojówek (VANPARYS i współaut. 2006).

Wśród kosmetyków zawierających ksenoestrogeny można wyróżnić też kremy z filtrami UV. Filtry UV stosowane są w celu ochrony skóry przed oparzeniami słonecznymi i uszkodzeniem materiału genetycznego, które może prowadzić do inicjacji kancerogenezy. Związki absorbujące promieniowanie ultrafioletowe stanowią od niedawna obiekt badań potencjalnego działania estrogenowego. Ryzyko narażenia na nie jest związane z ekspozycją transdermalną. 3-Benzofenon (BP3) oraz metoksycynamonian oktylu (OMC), 4-metylobenzylidenokamfor (4-MBC) odnaleziono w ludzkim mleku, moczu (4 godziny po zastosowaniu kremu) a także w środowisku: w rzekach, jeziorach i ściekach (KUNZ i FENT 2006).

Ksenoestrogeny mogą również zakłócać działanie układu immunologicznego. Wpływają one na syntezę cytokin, immunoglobulin i mediatorów komórkowych, a także zakłócają aktywację i przeżywanie komórek układu immunologicznego. Modulują odpowiedź immunologiczną poprzez wpływ na produkcję interleukiny 4 i przeciwciał IgE oraz zmieniają równowagę limfocytów Th1/Th2 (CHAŁUBIŃSKI i KOWALSKI 2006).

Związki endokrynnie aktywne mogą zachowywać się jak agoniści, antagoniści lub selektywne modulatory receptora estrogenowego. Działanie estrogenopodobne takich substancji daje realną szansę zastosowania ich w hormonalnej terapii zastępczej oraz w chemoprewencji i terapii hormonozależnych nowotworów piersi i narządów płciowych. Agoniści ER imitują działanie endogennych estrogenów, które występują w małych ilościach u kobiet w okresie menopauzy. Zmniejszony poziom endogennych estrogenów odpowiedzialny jest za takie negatywne objawy okresu menopauzy, jak uderzenia gorąca, zmiany nastroju, zaburzenia gospodarki lipidowej. Przykładem agoniści ER są niektóre fitoestrogeny. Według ostatnich badań dieta bogata w fitoestrogeny zmniejsza występowanie hormonozależnych nowotworów, takich jak rak piersi czy rak prostaty oraz wpływa pozytywnie na okres okołomenopauzalny (MATSUMURA i współaut.

2005). Natomiast antagoniści ER blokują interakcję endogennych estrogenów z receptorami estrogenowymi, co powoduje zahamowanie proliferacyjnego wpływu estrogenów na nowotwory. Znanym i stosowanym już w leczeniu antagonistą ER jest tamoksifen. Działa on jak antagonistą na komórki hormonozależnego nowotworu piersi, natomiast jak agonista na komórki hormonozależnego nowotworu macicy. Zatem należy on do selektywnych modulatorów receptora estrogenowego (HARRIS i współaut. 2005).

Z roku na rok rośnie liczba zidentyfikowanych związków o potencjalnym działaniu endokrynnym. Z tego względu należy zastanowić się nad ich wpływem na życie człowieka i innych organizmów. Pierwsze doniesienia o negatywnym działaniu EDC-s pochodzą z lat 40. ubiegłego wieku. Wykazano, że DDT powoduje obniżenie liczby plemników lub ich ruchliwości w ludzkiej spermie (oligospermia; oligozoospermia) (SANDERSON i współaut. 2002). Liczba plemników na 1 mililitr spadła na terenie Europy w latach 1940-1990 ze 170 do 70 milionów (DELBES i współaut. 2006).

Wpływ związków endokrynnie aktywnych na mężczyzn skutkuje głównie ich feminizacją. Obserwuje się stopniową demaskulinizację prowadzącą do impotencji i obniżenia męskiego libido (chlorodekon). Sugeruje się też, że związki te mogą zakłócać strukturę i funkcjonowanie jąder (ang. testicular dysgenesis syndrome) (SANDERSON i współaut. 2002). Coraz częściej odnotowuje się przypadki wnetrostwa i spodziectwa, między innymi w Anglii, Szwecji, Norwegii, Danii, Finlandii, Hiszpanii. Przypuszcza się, iż zjawisko to powiązane jest z ekspozycją na związki zakłócające układ endokrynni. W ostatnich latach wzrosła również zachorowalność na raka jąder oraz raka prostaty, chociaż nie określono jednoznacznie, czy ma to związek z substancjami hormonalnymi. Zapadalność na raka jąder w latach 1973-1997 na obszarze Ameryki Północnej wzrosła z 3,4% do 5,5%. Przypadki spodziectwa i wnetrostwa wzrosły podobnie z 0,2% do 2% oraz z 0,38% do 3,5% w latach 1970-1991 (DELBES i współ 2006).

OTYŁOŚĆ A ESTROGENY WYSTĘPUJĄCE W ŚRODOWISKU

Metabolizm tkanki tłuszczowej znajduje się pod kontrolą układu współczulnego i

jest modulowany przez hormony, w tym hormony płciowe. Wpływ estrogenów środowi-

skowych na metabolizm tkanki tłuszczowej może odbywać się poprzez bezpośrednią modulację lipogenezy, lipolizy i adipogenezy lub pośrednio poprzez spożycie pokarmu i wydzielanie leptyny skierowanej do ośrodkowego układu nerwowego lub homeostazą lipidów w wątrobie (COOKE i NAAZ 2004). Istnieje zależność pomiędzy stężeniem estrogenów w ciąży, na które narażone są zwierzęta i wagą potomstwa w wieku dorosłym (NEWBOLD i współaut. 2007b). Według eksperymentów prowadzonych przez grupę Newbold'a, płody myszy, narażone doświadczalnie na DES (ang. the estrogenic pharmaceutical chemical) w wieku dorosłym, wykazują znaczny wzrost masy ciała związany z nadmiarem tkanki tłuszczowej brzucha. U myszy narażonych na DES wraz ze wzrostem tkanki tłuszczowej zanotowano wzrost leptyny i adiponektyny, IL-6 (marker zapalny) i trójglicerydów (NEWBOLD i współaut. 2007a).

Badania *in vitro* za pomocą systemów kulturowych preadipocytów 3T3-L1 wykazały, że 4-nonylofenol i BPA stymulowane przez nagromadzone lipidy, przyspieszają ich różnicowanie w dojrzałe adipocyty (WADA i współaut. 2007). Mechanizm wydaje się odpowiadać za regulację ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm lipidów i różnicowanie adipocytów. W drugiej części eksperymentu obserwowano kumulacje tłuszczu w ludzkiej linii komórek raka wątroby narażonych na substancje zaburzające gospodarkę hormonalną (WADA i współaut. 2007). Ustalenia te są zgodne z poprzednimi badaniami *in vitro* komórek linii mysich fibroblastów w których istnieje związek pomiędzy środowiskowymi substancjami chemicznymi: w tym nonylofenolem, BPA i genisteiną, a rozwojem równowagi masy ciała (NEWBOLD i współaut. 2007a, b).

PODSUMOWANIE

W związku z rozwojem cywilizacji, zmianą stylu życia i przyzwyczajzeń, zagrożenie ekspozycją na substancje o słabym działaniu hormonalnym znacznie wzrasta. Opisało wiele związków zarówno wytworzonych przez człowieka, jak i występujących naturalnie, które mogą naśladować, antagonizować czy maskować działanie hormonów.

U kobiet ksenoestrogeny mogą zaburzać gospodarkę hormonalną cyklu menstruacyjnego. Ich działanie antykoncepcyjne powoduje zaburzenia płodności. Ekspozycja na związki endokrynnie czynne może zwiększać ryzyko raka piersi oraz raka endometrium. Niektóre badania sugerują, iż związki chloroorganiczne, takie jak DDT czy PCB, wpływają na podwyższenie prawdopodobieństwa wystąpienia tych nowotworów. Inne doniesienia wykazały, że kobiety narażone na działanie PCB lub ich pochodne rodziły dzieci ze zmniejszonym poziomem IQ, obniżoną zdolnością do zapamiętywania obrazów oraz zaburzeniami psychomotorycznymi.

Ksenoestrogeny, to duża grupa związków charakteryzująca się różnorodną budową chemiczną, szerokim zakresem występowania oraz znaczną aktywnością biologiczną. W świetle udokumentowanej wiedzy o ich działaniu stanowią obiecujący obiekt dalszych badań z ogromną szansą zastosowania ich w terapii przeciwnowotworowej bądź terapii menopauzy.

Zanotowano także wiele przypadków nieprawidłowości, których etiologii można doszukiwać się w ekspozycji na związki czynne hormonalnie. Badania doświadczalne na zwierzętach wskazują, jak poważne skutki może wywołać zakłócenie równowagi hormonów steroidowych w organizmie. Nie znamy okresów, w których ekspozycja na związki hormonalnie czynne byłaby bezpieczna.

Udowodniono, że zarówno ekspozycja w okresie płodowym, dzieciństwa, dojrzewania, jak i życiu dorosłym może doprowadzić do niepożądanych zmian w organizmie. Zmiany te nie obejmują tylko nieprawidłowości w układzie płciowym, prowadzących do zaburzeń płodności czy nowotworów gonad i dróg płciowych, ale działanie ksenoestrogenów znacznie wykracza poza układ płciowy. Ze względu na szerokie rozpowszechnienie receptorów estrogenowych, ksenoestrogeny są w stanie wywoływać działania niepożądane niemal we wszystkich tkankach i narządach. Dlatego niekontrolowana ekspozycja na ksenoestrogeny może być poważnym zagrożeniem dla zdrowia i życia człowieka oraz zwierząt.

Istnieje konieczność przeprowadzenia dalszych szczegółowych badań, nad wpływem tych substancji na środowisko. Badania powinny również dotyczyć poznania potencjału estrogenowego związków chemicznych i określenia bezpiecznych dawek, których

pochłonięcie nie spowoduje niekorzystnych zmian w organizmie. Badaniom biologicznym i analizom chemicznym powinny także towarzyszyć prace nad rozwiązaniami prawnymi problemu zawartości ksenoestrogenów

i ksenoandrogenów w żywności. Istnieje pilna potrzeba zmiany międzynarodowych regulacji prawnych dotyczących produkcji żywności.

ZWIĄZKI ENDOKRYNNIE AKTYWNE I ICH AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Streszczenie

Zanieczyszczenie środowiska naturalnego związkami chemicznymi, pochodzącymi z przemysłu oraz rozwoju nowych technologii nieodłącznie związane jest z wykorzystaniem niebezpiecznych dla zdrowia ludzi substancji, takich jak: polichlorowane bifenyle, dioksyny, pestycydy, fungicydy, herbicydy, składniki wyrobów plastikowych, leki, substancje wykazujące działanie przeciwdrobnoustrojowe oraz przeciwo-gniowe. Tego rodzaju związki zaliczane są do grupy związków endokrynnie aktywnych (EDCs), mających

zdolność modulacji aktywności układu hormonalnego oraz przyczyniających się do rozwoju anomalii reprodukcyjnych. Stąd, istnieje ogromna potrzeba monitorowania oraz ograniczenia niebezpiecznych związków chemicznych w wodach, glebie, powietrzu i żywności. W prezentowanej pracy przeglądowej ogólnie opisano wybrane grupy EDCs, metody ich detekcji oraz ich wpływ na system rozrodczy i metabolizm organizmów żywych.

ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS AND ITS BIOLOGICAL ACTIVITY

Summary

Contamination of environment with synthetic chemical compounds, originating from the industrialisation and technological development, connected with widespread use of hazardous substances such as: pesticides, plasticizers, drugs, antimicrobials, and flame retardants effects on human health. These chemicals called endocrine-disrupting compounds (EDCs) can modulate the activity of endocrine sys-

tem and result in developmental and reproductive abnormalities. So, there is a need of monitoring and limitation of such dangerous chemicals in food and water. In our review paper the characterization of selected EDCs is presented. Current methods of EDCs detection and potential impact of these compounds on reproductive system development and metabolism are also described.

LITERATURA

- AGGARWAL B., BHARDWAJ A., AGGARWAL R., 2004. *Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies*. *Anticancer Res.* 24, 2783-2840.
- ALMSTRUP K., FERNANDEZ M. F., PETERSEN J. H., OLEA N., SKAKKEBAEK N. E., LEFFERS H., 2002. *Dual effects of phytoestrogens in U-shaped does-response curves*. *Environ. Health Perspec.* 110, 743-748.
- ANAS M. K., GUILLEMETTE C., AYOTTE P., PEREG D., GIGUERE F., BAILEY J. L., 2005. *In utero and lactational exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture disrupts reproductive development and function in male rats*. *Biol. Reprod.* 73, 414-426.
- ANDERSEN H., VINGGAARD A., RASMUSSEN T., 2002. *Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179, 1-12.
- ANDERSSON A. M., SKAKKEBAEK N. E., 1999. *Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health*. *Eur. J. Endocrinol.* 140, 477-485.
- ARAVINDAKSHAN J., GREGORY M., MARCOGLIESE D. J., FOURNIER M., CYR D. G., 2004. *Consumption of xenoestrogen – contaminated fish during lactation alters adult male reproductive function*. *Toxicol. Sci.* 81, 179-189.
- ATANASSOWA N., MCKINNEL C., WALKER M., TURNER K. J., FISHER J. S., MORLEY M., MILLAR M. R., GROOME N. P., SHARPE R. M., 1999. *Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood*. *Endocrinology* 140, 5364-5373.
- BATTY J., LIM R., 1999. *Morphological and reproductive characteristics of male mosquito fish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in New South Wales, Australia*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 301-307.
- BJÖRKBLOM C., SALSTE L., KATSIADAKI I., WIKLUND T., RONBERG L., 2008. *Detection of estrogenic activity in municipal wastewater effluent using primary cell cultures from three-spined stickleback and chemical analysis*. *Chemosphere* vol. 73, 1064-1070.
- BLOM A., EKMAN E., JOHANNISSON A., 1998. *Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7)*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 306-310.
- BORTONE S. A., DAVIS W. P., 1994. *Fish intersexuality as indicator of environmental stress*. *Bioscience* 44, 165-172.
- BRIAN J. V., HARRIS C. A., SCHOLZE M., BACKHAUS T., BOOYP, LAMOREE M., POJANA G., JONKERS N., RUN-

- NALLS T., BONFA A., MARCOMINI A., SUMPTER J. P., 2005. *Accurate prediction of response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals*. Environ. Health. Perspec. 113, 721-728.
- CAMPBELL C. G., BORGLIN S. E., GREEN F. B., GRAYSON A., WOZEI E., STRINGFELLOW W. T., 2006. *Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water*. Chemosphere 65,1265-1280.
- CASSIDY A., 2003. *Potential risks and benefits of phytoestrogen-rich diets*. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 73, 120-126.
- CHALUBIŃSKI M., KOWALSKI M., 2006. *Endocrine disrupters - potential modulator of the immune system and allergic response*. Allergy 61, 1326-1335.
- COOKE P. S., NAAZ A., 2004. *Role of estrogens in adipocyte development and function*. Exp. Biol. Med. 229, 1127-1135.
- COSTA L., 1997. *Basic toxicology of pesticides*. Occup. Med. 12, 251-268.
- D'ASCENZO G., DI CORCIA A., GENTILI A., MANCINI R., MASTROPASQUA, R., NAZZARI M., SAMPERI R., 2003. *Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities*. Sci. Total. Environ. 302, 199-209.
- DELBES G., LEVACHER C., HABERT R., 2006. *Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development*. Reproduction 132, 527-538.
- DENTON T. E., HOWELL W. M., ALLISON J. J., MCCOLLUM J., MARKS B., 1985. *Masculinization of female mosquito fish by exposure to plant sterols and Mycobacterium smegmatis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35, 627-632.
- DESBROW C., ROUTLEDGE E. J., BRIGHTY G. C., SUMPTER J. P., WALDOCK M., 1998. *Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening*. Environm. Scien. Technol. 32, 1549-1558.
- FALCONER I. R., CHAPMAN H. F., MOORE M. R., RANMUTHUGALA G., 2006. *Endocrine Disrupting Compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water re-use*. J. Environm. Toxicol. 3, 101-112.
- FERNANDEZ M. P., IKONOMOU M. G., BUCHANAN I., 2007. *An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters*. Sci. Total. Environ. 373, 250-269.
- FISHER J., 2004. *Are all EDC effects mediated via steroid hormone receptors?* Toxicology 205, 33-41.
- FITZMAYER K. M., GEIGER J. G., VAN DEN AVYLE M. J., 1982. *Effects of chronic exposure to simazine on the cladoceran Daphnia pulex*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 11, 603-609.
- GABET V., MIÈGE C., BADOS P., COQUERY M., 2007. *Analysis of estrogens in environmental matrices, TrAC*. Trends Analyt. Chem. 26, 1113-1131.
- GARDINER T., RAMBERG J., 2001. *Plant estrogens: Importance in health and disease*. GlycoScience 2, 1-12.
- GIMENO S., KOMEN H., GERRITSEN A. G. M., BOWMER T., 1998a. *Feminisation of young males of the common carp, Cyprinus carpio, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation*. Aquat. Toxicol. 43, 77-92.
- GIMENO S., KOMEN H., JOBLING S., SUMPTER J., BOWMER T., 1998b. *Demasculinisation of sexually mature male common carp, Cyprinus carpio, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis*. Aquat. Toxicol. 43, 93-109.
- GIUSTI R. M., IWAMOTO K., HATCH E. E., 1995. *Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects*. Ann. Inter. Med. 122, 778-788.
- GOMES R. L., BIRKETT J. W., SCRIMSHAW, M. D., LESTER J. N., 2005. *Simultaneous determination of natural and synthetic steroid estrogens and their conjugates in aqueous matrices by liquid chromatography/mass spectrometry*. Int. J. Environ. Analyt. Chem. 85, 1-14.
- GOYAL H. O., ROBATEAU A., BRADEN T. D., WILLIAMS C. S., SRIVASTAVA K. K., ALI K., 2003. *Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood*. Biol. Reprod. 68, 2081-2091.
- GREIM H. A., 2004. *The endocrine and reproductive system; adverse effects of hormonally active substances?* Pediatrics 113, 1070-1075.
- GRUNFELD H., BONEFELD-JORGENSEN E., 2004. *Effect of in vitro estrogenic pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels*. Toxicol. Lett. 151, 467-480.
- HALL L., ROGERS J., DENISON M., 2005. *Identification of the herbicide Surflan and its active ingredient oryzalin, a dinitrosulfonamide, as xenoestrogens*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 48, 201-208.
- HARRIS D., BESSELINK E., HENNING S., 2005. *Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha or Beta-mediated responses in transfected breast cancer cells*. Exp. Biol. Med. 230, 558-568.
- HOFMEISTER M., BONEFELD-JORGENSEN E., 2004. *Effects of the pesticides prochloraz and methiocarb on human estrogen receptor alpha and beta mRNA levels analyzed by on-line RTPCR*. Toxicol. In Vitro 18, 427-433.
- IRVINE C. H., SHAND N., FITZPATRICK M. G., ALEXANDER S. L., 1998. *Daily intake and urinary excretion of genistein and daidzein by infants fed soy- or dairy-based infant formulas*. Am. J. Clin. Nutr. 68, 1462-1465.
- JOBLING S., SHEAHAN D., OSBORNE J. A., MATTHIESSEN P., SUMPTER J. P., 1996. *Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals*. Environ. Toxicol. Chem. 15, 194-202.
- JOFFE M., 2002. *Are problems with male reproductive health caused by endocrine disruption?* Occup. Environ. Med. 58, 281-290.
- KATASE T., OKUDA K., KIM Y. S., EUN H., TAKADA H., UCHIYAMA T., SAITO H., MAKINO M., FUJIMOTO Y., 2008. *Estrogen equivalent concentration of 13 branched para-nonylphenols in three technical mixtures by isomer-specific determination using their synthetic standards in SIM mode with GC-MS and two new diastereomeric isomers*. Chemosphere 70, 1961-1972.
- KIM, Y.S., KATASE T., SEKINE S., INOUE T., MAKINO M., UCHIYAMA T., FUJIMOTO Y., YAMASHITA N., 2004. *Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography*. Chemosphere 54, 1127-1134.
- KOH Y. K. K., CHIU T. Y., BOOBIS A., CARTMELL E., LESTER J. N., SCRIMSHAW M. D., 2007. *Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1173, 81-87.
- KOLPIN D. W., SKOPEC M., MEYER M. T., FURLONG E. T., ZAUGG S. D., 2004. *Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions*. Scien. Tot. Environm. 328, 119-130.
- KRIS-ETHERTON P., HECKER K., BONANOME A., 2002. *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer*. Am. J. Med. 113 (Suppl. 9B), 71-88.
- KUNZ P., FENT K., 2006. *Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish*. Aquat. Toxicol. 79, 305-324.

- KURZER M., 2003. *Phytoestrogen supplement use by women*. J. Nutr. 133, 1983S-1986S.
- LATCH D. E., PACKER J. L., ARNOLD W. A., MCNEILL K., 2003. *Photochemical conversion of Triclosan to 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution*. J. Photochem. Photobiol. Anal. Chem. 158, 63-66.
- LEFFERS H., NEASBY M., VANDELBO B., SKAKKEBEAK N. E., JORGENSEN M., 2001. *Oestrogenic potencies of zearanol, estradiol, diethylstilbestrol, bisfenol A, and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disruptors*. Hum. Reprod. 16, 1037-1045.
- LEMAIRE G., MNIF W., MAUVAIS P., 2006. *Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines*. Life Sci. 79, 1160-1169.
- LIMER J., SPEIRS V., 2004. *Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention*. Breast Canc. Res. 6, 119-127.
- MARAS M., VANPARYS C., MUYLLE F., 2006. *Estrogen-like properties of fluorotelomer alcohols as revealed by mcf-7 breast cancer cell proliferation*. Environ. Health Perspect. 114, 100-105.
- MARTIN M., REITER R., PHAM T., 2003. *Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells*. Endocrinology 144, 2425-2436.
- MATSUMURA A., GHOSH A., POPE G., 2005. *Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells*. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 94, 431-443.
- MCLACHLAN J. A., 2001. *Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals*. Endocr. Rev. 22, 319-341.
- MERRITT R. J., JENKS B. H., 2004. *Safety of soy based infant formulas containing isoflavones: the clinical evidence*. J. Nutr. 134, 1220-1224.
- MINERVINI F., GIANNOCCARO A., CAVALLINI A., 2005. *Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters*. Toxicol. Lett. 159, 272-283.
- MORITO K., AOMORI T., HIROSE T., KINJO J., HASEGAWA J., OGAWA S., INOUE S., MURAMATSU M., MASAMUNE Y., 2002. *Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II)*. Biol. Pharm. Bull. 25, 48-52.
- MUELLER S., 2004. *Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods*. Anal. Bioanal. Chem. 378, 582-587.
- MURKIES A. L., WILCOX G., DAVIS S. R., 1998. *Clinical review 92. Phytoestrogens*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 83, 297-303.
- NEWBOLD R. R., PADILLA-BANKS E., SNYDER R. J., JEFFERSON W. N., 2007b. *Perinatal exposure to environmental estrogens and the development of obesity*. Mol. Nutr. Food Res. 51, 912-917.
- NEWBOLD R. R., PADILLA-BANKS E., SNYDER R. J., PHILLIPS T. M., JEFFERSON W. N., 2007a. *Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic*. Reprod. Toxicol. 23, 290-296.
- NIETO A., BORRULL F., POCURULL E., MARCÉ R. M., 2008. *Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromat. A 1213, 224-230.
- NIMROD A., C., BENSON W. H., 1998. *Reproduction and development of Japanese edaka following an early life stage exposure to xenoestrogens*. Aquat. Toxicol. 44, 141-156.
- PANICKER R. C., CHATTOPADHAYA S., YAO S. Q., 2006. *Advanced analytical tools in proteomics*. Analytica. Chimica. Acta. 556, 69-79.
- PETROVIC M., BARCELO D., 2000. *Determination of Anionic and Nonionic Surfactants, Their Degradation Products, and Endocrine-Disrupting Compounds in Sewage Sludge by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*. Anal. Chem. 72, 4560-4567.
- RANKOUHI T. R., VAN HOLSTEIJN I., LETCHER R., GIESY J. P., VAN DEN BERG M., 2002. *Effects of Primary Exposure to Environmental and Natural Estrogens on Vitellogenin Production in Carp (Cyprinus carpio) Hepatocytes*. Toxicol. Sci. 67, 75-80.
- RHOUMA K. B., TÉBOURBI O., KRICHAN R., SAKLY M., 2001. *Reproductive toxicity of DDT in adult male rats*. Hum. Exp. Toxicol. 20, 393-397.
- ROBERTSON K. M., O'DONNELL L., SIMPSON E. R., JONES M. E., 2002. *The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function*. Endocrinology 143, 2913-2921.
- ROCHIRA V., GRANATA A. R., MADEO B., ZIRILLI L., ROSSI G., CARANI C., 2005. *Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years?* Asian. J. Androl. 7, 3-20.
- ROSSELLI M., REINHART K., IMTHURN B., KELLER P. J., DUBEY R. K. 2000. *Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function*. Hum. Reprod. Update. 6, 332-350.
- ROUTLEDGE E. J., SUMPTER J. P., 1997. *Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity*. J. Biol. Chem. 272, 3280-3288.
- SANDERSON J., BOERMA J., LANSBERGEN G., 2002. *Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 182, 44-54.
- SENCZUK W. (red.), 2002. *Toksykologia pestycydów*. [W:] Toksykologia. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 538-544, 615-617.
- SETCHELL K. D., 2001. *Soy isoflavons . benefits and risks from nature's Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs)*. Am. J. Clin. Nutr. 20, 354-362.
- SHARPE R. M., 2001. *Hormones and testis development and possible adverse effects of environmental chemicals*. Toxicol. Lett. 120, 221-232.
- SHARPE R. M., IRVINE D. S., 2001. *Clinical review. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health?* Br. Med. J. 328, 447-451.
- SOTO A. M., CALABRO J. M., PRECHTL N. V., YAU A. Y., ORLANDO E. F., DAXENBERGER A., KOLOK A. S., GUILLETTE L. J., LE BIZEC B., LANGE I. G., SONNENSCHNEIN C., 2004. *Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in eastern Nebraska USA*. Environ. Health. Perspec. 112, 346-352.
- STOICA A., PENTECOST E., MARTIN M., 2000. *Effects of arsenite on estrogen receptor-alpha expression and activity in MCF-7 breast cancer cells*. Endocrinol. 141, 3595-3602.
- SUMPTER J. P., 2005. *Endocrine disruptors in the aquatic environment: an overview*. Acta. Hydrochim. Hydrobiol. 33, 9-16.
- TERNES, T. A., STUMPF M., MUELLER J., HABERER K., WILKEN R. D., SERVOS M., 1999. *Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil*. Sci. Total Environ. 225, 81-90.
- TOPPARI J., HAAVISTO A. M., ALANEN M., 2002. *Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries*. Cad. Saude. Publica. 18, 413-420.

- TOYAMA Y., SUZUKI-TOYOTA F., MAEKAWA M., ITO C., TOSHIMORI K., 2004. *Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats*. Arch. Histol. Cytol. 67, 373-381.
- TURNER K. J., SHARPE R. M., 1997. *Environmental oestrogens – present understanding*. Rev. Reprod. 2, 69-73.
- USUI T., 2006. *Pharmaceutical prospects of phytoestrogens*. Endocr J. 53, 7-20.
- VAN DEN BELT K., BERCKMANS P., VANGENECHTEN C., VERHEYEN R., WITTERS H., 2004. *Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17[beta]-estradiol, estrone, 17[alpha]-ethynylestradiol and nonylphenol*. Aquat. Toxicol. 66, 183-195.
- VANPARYS C., MARAS M., LENJOU M., 2006. *Flow cytometric cell cycle analysis allows for rapid screening of estrogenicity in MCF-7 breast cancer cells*. Toxicol. in Vitro 20, 1238-1248.
- WADA K., SAKAMOTO H., NISHIKAWA K., SAKUMA S., NAKAJIMA A., FUJIMOTO Y., KAMISAKI Y., 2007. *Life style-related diseases of the digestive system: Endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome*. J. Pharmacol. Sci. 105, 133-137.
- WARING R., HARRIS R., 2005. *Endocrine disruptors: a human risk?* Mol. Cell. Endocrinol. 244, 2-9.
- WEBER K. S., SETCHELL K. D., STOCO D. M., LEPHARD E. D., 2001. *Dietary soy phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague – Downey rats*. J. Endocrinol. 170, 591-599.
- WEYER P., RILEY D., 2001. *Endocrine disruptors and pharmaceuticals in drinking water*. Denver, CO: AWWA Research Foundation and The American Water Works Association.
- WIŚNIEWSKI A. B., KLEIN S. L., LAKSHAMANAN Y., GEARTHART J. P. 2003. *Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats*. J Urolog. 169, 1582-1586.
- WITORCH R. J., 2002. *Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted?* Regul. Toxicol. Pharmacol. 36, 118-130.
- WOBER J., WEISSWANGE I., VOLLMER G., 2002. *Stimulation of alkaline phosphatase activity in Ishikawa cells induced by various phytoestrogens and synthetic estrogens*. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 83, 227-233.
- YAMADA, K. M., 2008. *Whole Organism and Tissue Analysis*. Current Protocols in Cell Biology. Wiley Online Library 41:19.0.1-9.0.2.