

# Badania toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej – aspekty medyczne i weterynaryjne

MARIA MINTA

Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Minta M.

## Reproductive and developmental toxicity testing – medical and veterinary aspects

### Summary

Many different sorts of evaluations, including reproductive and developmental studies, are required to establish the safety of chemicals. However, *in vivo* studies are expensive, time consuming and require a large number of animals and thus no information is available for the majority of existent or new compounds. Known human teratogens account for only 6-10% of all birth defects and little is known about the causes of infertility in both humans and animals. Over the last few years there has been a growing concern about xenoestrogens and veterinary drug residues in food being potential reproductive and developmental toxicants. The paper proposes alternative methods to both accelerate research and reduce the number of animals used.

**Keywords:** xenobiotics, toxicity, reproduction

Obecność substancji obcych w środowisku (ksenobiotyki) jest m.in. efektem rozwoju przemysłu i towarzyszących mu odpadów, ścieków i pyłów, jak również stosowania środków ochrony roślin i nawozów sztucznych w rolnictwie. Te i inne substancje mogą przedostawać się do organizmu człowieka różnymi drogami (inhalacyjną, przez skórę, doustną etc.), mogą ulegać kumulacji w różnych tkankach oraz narządach i w zależności od wieku powodować różne (w tym także odległe) skutki zdrowotne (31). Problem szkodliwego oddziaływania ksenobiotyków nabiera szczególnego znaczenia w okresie reprodukcyjnym. Rozmnażanie jest bowiem kompleksem następujących po sobie złożonych procesów biologicznych, począwszy od gametogenezy poprzez zapłodnienie, implantację, rozwój zarodkowy, płodowy, poród, a na rozwoju fizycznym i dojrzewaniu płciowym w okresie postnatalnym skończywszy. Toksyczne oddziaływanie związków chemicznych na poszczególnych etapach może powodować określone skutki. W okresie gametogenezy może dojść do uszkodzenia komórek rozrodczych i objawiać się bezpłodnością. Działanie silnych czynników w tym okresie może również prowadzić do mutacji i dalszych wynikających z tego konsekwencji biologicznych (gametotoksyczność). W stadium blastogenezy zachodzą intensywne procesy podziału, w których wyniku tworzy się węzeł zarodkowy i trofoblast. W przypadku zadziałania czynnika toksycznego w tym okresie, najczęściej dochodzi do wczesnego zamierania zarodków (embriotoksyczność). Kolejny okres embriogenezy cechuje się zmianą systemu odżywiania, szybkim roz-

wojem narządów zarodka i różnicowaniem tkanek. Jest to okres największej wrażliwości na wadotwórcze (teratogenne) działanie czynników zarówno endo-, jak i egzogennych. Stadium fetogenezy jest okresem dojrzewania płodu. W tym czasie, z wyjątkiem układu nerwowego i rozrodczego, wrażliwość na teratogeny jest mała, a działanie fetotoksyczne najczęściej objawia się zahamowaniem rozwoju płodu (mniejsza masa, opóźniona osteogeneza), zaburzeniami hormonalnymi lub behawioralnymi w okresie postnatalnym.

Podstawowym zadaniem badań toksykologicznych, w tym także badania toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej, jest zdobycie wiedzy na temat toksycznego oddziaływania ksenobiotyków należących do różnych grup (leki, dodatki do żywności, barwniki, środki ochrony roślin i zwierząt, kosmetyki, środki czyszczące i dezynfekcyjne) i ocena ryzyka dla zdrowia człowieka celem zapobiegania lub ograniczenia potencjalnych skutków szkodliwych.

Dane piśmiennictwa wskazują, że działanie toksyczne dla procesów reprodukcyjnych w eksperymentach na zwierzętach wykazuje ponad 3 tysiące związków chemicznych, z czego połowa charakteryzuje się działaniem teratogennym u 1 lub więcej gatunków (28). Równocześnie, w blisko 70% przypadków wad rozwojowych u ludzi przyczyny nie zostały rozpoznane. W ciągu ostatnich lat obserwuje się nagromadzenie piśmiennictwa dostarczającego coraz więcej danych o oddziaływaniu na procesy rozwoju i rozrodu substancji naruszających układ hormonalny – ksenoestrogenów (8, 11, 12, 30).

Celem opracowania było przybliżenie aktualnego stanu wiedzy nt możliwości badań z zakresu toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej oraz ich znaczenia w medycynie i weterynarii.

### Badania na zwierzętach

Podobnie jak i w innych rodzajach badań toksykologicznych, także do oceny toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej stosowane są metody o dużym stopniu standaryzacji, pozwalające na ocenę określonych wskaźników, ważnych w procesie szacowania ryzyka dla zdrowia (13, 19). Szczegółowe dane z tego zakresu można znaleźć na stronach internetowych (26). Eksperymenty na zwierzętach laboratoryjnych obejmują dwie kategorie badań: pierwsza odnosi się do osobników żeńskich i obejmuje okres ciąży oraz rozwój postnatalny potomstwa, druga obejmuje pozostałe etapy cyklu reprodukcyjnego, zarówno u samic, jak i u samców.

Badania pierwszej kategorii wykonuje się na 3 gatunkach zwierząt (2 gatunki gryzoni i królik), stosując przynajmniej 3 poziomy dawki. Badany związek podaje się przynajmniej przez tę część ciąży, która obejmuje okres organogenezy, drogą zbliżoną do przewidywanej drogi narażenia, a następnie (na 1 lub 2 dni przed porodem) ocenia się matki, zarodki i płody. Wskaźnikami w tej ocenie są wczesne i późne resorpcje zarodków (embriotoksyczność), śmierć lub zahamowanie rozwoju płodów (fetotoksyczność), wady rozwojowe u płodów (teratogenność) i inne odchylenia od normy (1, 17). Część ciężarnych samic pozostawia się do porodu i obserwuje rozwój fizyczny noworodków, a następnie w różnych przedziałach wiekowych ocenia się inne wskaźniki pozwalające na ocenę wpływu badanego związku na układ nerwowy: odruchy (np. w testach negatywnej geotaksji i repozycji), koordynację ruchową (np. w teście pływania), ogólną aktywność (np. w teście otwartego pola) etc.

Do badań drugiej kategorii należą testy kojarzeniowe, które najczęściej wykonuje się na gryzoniach (2-5). Dostarczają one informacji dotyczących wpływu na funkcje rozrodcze samców i samic, takich jak: czynności gruczołów płciowych, cykl rujowy, zachowanie się w czasie kojarzenia, zapłodnienie, poród, karmienie, wzrost i rozwój potomstwa, i służą jako wskaźniki do badań szczegółowych. Zalecane są dodatkowe badania, w których po okresie ekspozycji u obu płci przeprowadza się szczegółowe badanie układu rozrodczego (histopatologia jąder i jajników), badanie nasienia samców (liczba, ruchliwość, morfologia i zdolność do zapłodnienia), badanie cytologiczne nabłonka pochwy samic (przebieg cyklu rujowego), a także oznaczenia poziomu hormonów w surowicy krwi.

Należy podkreślić, że badania *in vivo* są bardzo czasochłonne, kosztowne i wymagają użycia dużej liczby zwierząt. W wyniku nowych regulacji prawnych związanych z ochroną zwierząt, badania na zwierzętach mogą być wykonywane tylko w uzasadnionych przypadkach (np. w badaniach przedklinicznych leków,

Tab. 1. Niektóre leki weterynaryjne teratogenne w badaniach na zwierzętach (wg Hurtt i wsp., 2003)

Związek	Teratogeny*	Związek	Teratogeny*
Trimetoprim	M, I	Triazynowe	
Chinolony		Diklazuril	Sz, I
Danofloxacyna	M, I	Toltrazuril	M, I
Sarafloksacyna	Sz, I	Awermektyny	
Aminoglikozydy		Abamektyna	Sz, K, I
Apramycyna	Sz, I	Doramektyna	Sz, I
Nitrofurual	Sz, I	Iwermektyna	M, Sz, K, I
Benzoimidazole		Pochodne benzodiazepiny	M, I
Albendazol	M, Sz, I	Fenotiazyny	
Flubendazol	M, I	Chlorpromazyna	M, K, I
Mebendazol	M, K, I	Klenbuterol	M, Sz, I
Oxfendazol	M, I	Kortykoidy (glukokortykoidy)	
Tiabendazol	K, I	Hydrokortizon	Sz, K, I
Piperazyny		Dermatologiczne	
Piperazyna	Sz, I	Bronpol	Sz, I

Objaśnienia: \*M – mysz, Sz – szczur, K – królik, I – inne gatunki

dotyków do żywności) i po zaopiniowaniu przez komisję bioetyczną. Dla badania pozostałych grup związków poszukuje się nowych rozwiązań (21).

### Metody alternatywne do badań na zwierzętach

W ramach nowej reformy prawa UE, celem zapewnienia odpowiedniej kontroli nad produkcją i obrotem związkami chemicznymi produkowanymi na dużą skalę, opracowany został tzw. projekt REACH (Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals). Głównym założeniem tego programu jest przyspieszenie badań (planuje się przebadanie w najbliższych 15 latach około 30 000 substancji). W realizacji programu REACH planuje się większe wykorzystanie metod alternatywnych takich jak QSAR (quantitative structure – activity relationships), techniki *in vitro*, badania epidemiologiczne i ograniczenia zużycia zwierząt w badaniach (15). Z tego względu w ostatnim czasie w Polsce podejmowane są próby utworzenia tzw. Platformy Porozumienia ds. Rozwoju Metod Alternatywnych. Szczegółowe informacje nt. metod alternatywnych można znaleźć na stronach internetowych (14). Polska Platforma weszłaby w skład ogólnoeuropejskiej, niedochodowej organizacji pod nazwą ECOPA (European Consensus Platform for Alternatives) z siedzibą w Brukseli, zrzeszającej podobne organizacje z innych krajów Europy. Najogólniej, celem działań ECOPA jest stworzenie paneuropejskiego związku przedstawicieli przemysłu, nauki, rządu i obrońców praw zwierząt, który zajmowałby się harmonijnym wprowadzaniem idei 3R (Reduction, Refinement, Replacement) w badaniach biomedycznych.

Niedawno ukazało się opracowanie (10), w którym przedstawiono zupełnie nowe, aczkolwiek dyskusyjne, podejście do badania „toksyczności” żywności pochodzenia roślinnego (warzywa, owoce, soki) w 4 testach *in vitro*. Toksyczność rozwojową oceniano w teście hodowli pierwotnej komórek zarodkowych (micromass assay), działanie estrogenne – w teście ER (Estrogen receptor transactivation assay). Autorzy konkludują, że ten rodzaj badań może być przydatny do wykrywania toksyn, których obecność jest trudna do przewidzenia i może być sygnałem do dalszych ukierunkowanych badań.

Nie ulega jednak wątpliwości, że w wykrywaniu związków teratogennych dla człowieka największą wartość mają wyniki dobrze przeprowadzonych badań epidemiologicznych, które po opracowaniu przez specjalnie powołane do tego celu grupy specjalistów przekazywane są do organizacji zajmujących się np. monitorowaniem częstości występowania wad rozwojowych, ich rejestrowaniem i wykrywaniem związków przyczynowych. Przykładem takiej organizacji w Europie jest ENTIS (European Network of Teratology Information Services, <http://www.entis-org.com>). Badania epidemiologiczne są trudne do zorganizowania. Ich przydatność może być różna i zależy od charakteru badań (retrospektywne, prospektywne, kohortowe etc).

### Aspekty medyczne i weterynaryjne zaburzeń rozrodu

Jak dotąd problem zaburzeń reprodukcyjnych u zwierząt użytkowych postrzegany był w sposób nieco odmienny od problemu zaburzeń prokreacji człowieka.

W przypadku ludzi zjawiskiem o pierwszorzędym znaczeniu było powstawanie wad rozwojowych. Kalekie czy niepełnosprawne dziecko, oprócz aspektu zdrowotnego, to także problem emocjonalny i społeczny. W dostępnych opracowaniach naukowych podaje się, że wady rozwojowe w chwili urodzenia wykazuje 3-7% noworodków, przy czym odsetek ten znacznie wzrasta jeśli uwzględni się zaburzenia ujawniające się w okresie późniejszym. Ostatnio coraz większą uwagę zwraca niepokojący wzrost niepłodności wśród młodych małżeństw.

W weterynarii niepowodzenia w rozrodzie zwierząt wiąże się na ogół ze zwiększoną śmiertelnością przed i okołoporodową (20) i w następstwie tego dużymi stratami ekonomicznymi. Jeszcze do niedawna głównych przyczyn upatrywano w czynnikach o podłożu genetycznym i zakaźnym. Ostatnio coraz częściej wskazuje się na różne przyczyny i dostrzega wagę innych zaburzeń w rozrodzie (22-25). Wydaje się zatem, że przy rozpatrywaniu zagadnień związanych z zaburzeniami rozrodu zwierząt najważniejszym źródłem informacji o potencjalnych przyczynach może być wywiad oraz dokładna dokumentacja. Zdobyta w ten sposób wiedza, w zestawieniu ze znajomością różnic gatunkowych dotyczących metabolizmu związków chemicznych, rodzaju i częstości zaburzeń spontanicznych

powinna pomóc w prawidłowej interpretacji związku przyczynowego pomiędzy potencjalnym czynnikiem a obserwowanymi efektami tak, jak to ma miejsce w doświadczeniach na zwierzętach laboratoryjnych (27). Jeśli chodzi o zwierzęta domowe i użytkowe to lekarzom praktykom znana jest zapewne pewna specyficzność wad wrodzonych charakterystycznych dla poszczególnych gatunków. U psów np. najczęściej obserwuje się dysplazję stawów biodrowych, u prosiąt – przepukliny pachwinowe i mosznowe oraz niedrożność odbytu, a u cieląt i źrebiąt – skrzywienie szyi oraz przykurcz ścięgien i mięśni kończyn.

### Czynniki ryzyka dla człowieka

W różnych opracowaniach liczbę czynników teratogennych dla ludzi ocenia się na około 20-40. Różnice te wynikają z dwóch zasadniczych powodów: pierwszy dotyczy zakresu uogólnienia, drugi związany jest z kontrowersyjnymi opiniami co do niektórych leków, m.in. z grupy antybiotyków, leków psychotropowych, sulfonamidów i leków przeciwzapalnych. Istnieje jednak określona lista tzw. uznanych teratogenów (28, 29). Ponad wszelką wątpliwość wady rozwojowe stwierdza się u noworodków w wyniku infekcji w czasie ciąży wirusami toksoplazmy, różyczki, cytomegalii i herpes. Do najcięższych wad, jakie powodują, należą wady słuchu i wzroku. Spośród innych czynników o wysokim stopniu ryzyka uszkodzenia płodu jest promieniowanie i zaburzenia metaboliczne u matki, np. cukrzyca, fenyloketonuria, niedobór kwasu foliowego.

Klasycznym przykładem teratogennego leku jest talidomid powodujący uszkodzenia i/lub brak kończyn u płodów. Obok niego najczęściej wymienia się: aminopterynę i inne antymetabolity, androgeny i estrogeny, busulfan i inne związki alkilujące, hormony i antyhormony, jod i związki, leki przeciwdrgawkowe (fenytoina, karbamazepina, kwas walpronowy), witaminę A i analogi.

### Czynniki środowiskowe powodujące zaburzenia reprodukcyjne u zwierząt hodowlanych

Na podstawie istniejącej wiedzy za główne przyczyny niepowodzeń hodowlanych, poza zakaźnymi i o podłożu genetycznym, uważa się pasze zielone (zawierające trujące alkaloidy), źle przechowywane pasze przemysłowe (zawierające np. mikotoksyny), zanieczyszczenia przemysłowe (np. toksyczne pierwiastki), środki ochrony roślin (np. zaburzające układ hormonalny) i środki ochrony zwierząt (np. leki o działaniu teratogennym).

Dość dawno wykryto związek przyczynowy pomiędzy zjadaniem przez ciężarne zwierzęta niektórych roślin i pojawianiem się wad u potomstwa, za które odpowiedzialne są alkaloidy zawarte w tych roślinach (18): łubin żółty (*Lupinus*) – zniekształcenia kończyn, szczelina podniebienia i skrzywienia kręgosłupa u cieląt, koniczyna szwedzka (*Trifolium hybridum*) – ronienia u macior, szczywól plamisty (*Conium macula-*

tum) – uszkodzenia CUN u prosiąt, ziemniak (*Solanum tuberosum*) – jego zielone jagody zawierają solaninę wywołującą rozszczep kręgosłupa i uszkodzenia mózgu, ciemniżyca (*Veratrum*) – krytycznym okresem dla indukowania uszkodzeń u płodów owiec i kóz jest 14. dzień ciąży (cykloplia, wodogłowie), w wyniku narażenia w późniejszej ciąży zniekształceniom ulegają kończyny.

Do najlepiej poznanych mikotoksyn toksycznych dla procesów reprodukcyjnych u zwierząt należą aflatoksyny, ochratoksyny, alkaloidy sporyszu i zearalenon (23). Wśród zwierząt użytkowych gatunkiem najbardziej wrażliwym na estrogenne działanie zearalenonu są świnię (24).

Liczne badania dowodzą, że niepowodzenia reprodukcyjne związane są z rejonami uprzemysłowionymi, w których stwierdza się zwiększone ilości metali ciężkich (rtęć, kadm, ołów, arsen) i innych toksycznych pierwiastków (np. endemiczne występowanie związków selenu czy fluoru). Dobrym materiałem w badaniach epidemiologicznych nad występowaniem tych zanieczyszczeń jest woda pitna (9).

Spośród 72 chemicznych zanieczyszczeń środowiska o udowodnionym działaniu na układ rozrodczy 23 związki działają także na układ hormonalny (30), w tym m.in.: herbicydy (alachlor), fungicydy (heksachlorobenzen), insektycydy (aldryna, dikofol, dieldryna, endryna,  $\beta$ -HCH, heptachlor, mireks, toksafen, transnonachlor) oraz ftalany, PBB, PCB, PCDD (dioksyny), PCDF (furany).

Problem leków weterynaryjnych ma dwa zasadnicze aspekty toksykologiczne. Pierwszy dotyczy ich bezpiecznego stosowania u zwierząt docelowych, drugi odnosi się do problemu pozostałości w tkankach leczonych zwierząt przeznaczonych do konsumpcji. O wadze problemu świadczą nowe przepisy UE ukierunkowane w sposób zdecydowany na wykrywanie zagrożeń dla człowieka, w tym wynikających ze strony żywności pochodzenia zwierzęcego. Zaważyło to w sposób zdecydowany na charakterze badań kontrolnych żywności, w których nastąpiło przesunięcie punktu ciężkości w kierunku analiz na obecność substancji o charakterze anabolicznym i pozostałości leków weterynaryjnych. Jednocześnie obserwuje się wzrost zainteresowania oceną toksyczności prenatalnej leków weterynaryjnych. Dowodem na to są oddzielne zalecenia sposobu badania i interpretacji wyników (6, 7), a także coraz częściej ukazujące się prace doświadczalne z tego zakresu. W tab. 1 przedstawiono wykaz leków teratogennych dla dwóch lub więcej gatunków zwierząt wg opracowania Hurtt i wsp. (16).

## Piśmiennictwo

1. Anon.: TG 414: Prenatal Developmental Toxicity Study. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paryż 2001.
2. Anon.: TG 415: One-Generation Reproduction Toxicity. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paryż 1983.
3. Anon.: TG 416: Two-Generation Reproduction Toxicity. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paryż 2001.
4. Anon.: TG 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paryż 1995.
5. Anon.: TG 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paryż 1996.
6. Anon.: CVMP/VICH/485/02 VICH Topic GL 32 Step7 – Safety Studies for Veterinary Drug Residues in Human Food: Developmental Toxicity Testing (CVMP adopted November 02 – updated June 04).
7. Anon.: CVMP/VICH/525/00 VICH Topic GL 22 Step7 – Safety Studies for Veterinary Drug Residues in Human Food: Reproduction Studies (updated June 04).
8. Birnbaum L. S.: Developmental effects of dioxins, [w:] Reproductive and Developmental Toxicology. Kenneth S. Korach, Marcel Dekker (ed.), Inc. New York 1998, 87-112.
9. Calderon R. L.: The epidemiology of chemical contaminants of drinking water. Food Chem. Toxicol. 2000, 38, S13-S20.
10. Charles G. D., Linscombe V. A., Tornesi B., Mattson J. L., Gollapudi B. B.: An in vitro screening paradigm for extracts of whole foods for detection of potential toxicants. Food Chem. Toxicol. 2002, 40, 1391-1402.
11. Daston G. P., Gooch J. W., Breslin W. J., Shuey D. L., Nikiforov A. I., Fico T. A., Gorsuch J. W.: Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. Reprod. Toxicol. 1997, 11, 465-481.
12. Długosz A.: Estrogenne działanie ksenobiotyków. Farmacja Polska 1998, 54, 1068-1072.
13. Guittin P., Elefant E., Saint-Salvi B.: Hierarchization of animal teratology findings for improving the human risk evaluation of drugs. Reprod. Toxicol. 2000, 14, 369-375.
14. Hakkinen P. J. B., Green D. K.: Alternatives to animal testing: information resources via internet and world wide web. Toxicology 2002, 173, 3-11.
15. Höfer T., Gerner I., Gundert-Remy U., Liebsch M., Schute A., Spielmann H., Vogel R., Wetting K.: Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. Arch. Toxicol. 2004, 78, 549-564.
16. Hurtt M. E., Cappon G. D., Browning A.: Proposal for tiered approach to developmental toxicity testing for veterinary pharmaceutical products for food-producing animals. Food Chem. Toxicol. 2003, 41, 611-619.
17. Juszkiewicz T., Minta M.: Teratologia doświadczalna – ocena ryzyka szkodliwości prenatalnej, [w:] Mat. VIII Sympozjum Chirurgów Dziecięcych Pomorza Zachodniego, Szczecin 1993, s. 34-48.
18. Keeler R. F.: Teratogens in plants. J. Anim. Sci. 1984, 58, 1029-1039.
19. Koëter H. B. W. M.: Testing and risk assessment strategies: international perspectives. Reprod. Toxicol. 1997, 11, 453-456.
20. Max A.: Obumieralność zarodków u zwierząt. Medycyna Wet. 1991, 47, 416-418.
21. Minta M., Włodarczyk B.: Toksykologia reprodukcji w obliczu wprowadzania metod alternatywnych. Medycyna Pracy 1996, 47 (Supl. 6), 93-103.
22. Osweiler G. D.: Toxicology of the Reproductive System. Chapter 12, [w:] Toxicology. Williams and Wilkins. A Waverly Company, Philadelphia 1996.
23. Panigrahi S.: Bioassay of mycotoxins using terrestrial and aquatic animal and plant species. Food Chem. Toxicol. 1993, 31, 767-790.
24. Pejsak Z.: Mikotoksyny – przyczyna zaburzeń w rozrodzie oraz zachorowań świń. Medycyna Wet. 1997, 53, 246-249.
25. Plumlee K. H.: Chapter 14. Reproductive System, [w:] Clinical Veterinary Toxicology. Mosby, St. Luis, Missouri 2004.
26. Polifka J. E., Faustman E. M.: Developmental toxicity: web resources for evaluating risk in humans. Toxicology 2002, 173, 35-65.
27. Schardein J. L., Schwetz B. A., Kenel M. F.: Species sensitivities and prediction of teratogenic potential. Environ. Health Perspect. 1985, 61, 55-67.
28. Shepard T.: Catalogue of Teratogenic Agents. The John Hopkins University Press, Baltimore and London 2004.
29. Shehata H. A., Nelson-Piercy C.: Drugs to avoid in pregnancy. Curr. Obstetr. Gynaecol. 2000, 10, 44-52.
30. Struciński P., Ludwicki J. K., Góralczyk K., Czaja K.: Wybrane aspekty działania ksenoestrogenów z grupy persystentnych związków chloroorganicznych. Roczn. PZH 2000, 51, 211-228.
31. Tarkowski S.: Wybrane aktualne trendy w toksykologii środowiskowej. Medycyna Pracy 1999, 50 (Supl. 12), 1-24.

Adres autora: dr Maria Minta, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;  
e-mail: mamin@piwet.pulawy.pl