

Wykrywanie i ocena aktywności związków hormonalnie aktywnych

MARIA MINTA, SYLWIA STYPUŁA-TRĘBAS

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

Minta M., Stypuła-Trębas S.

Hormonally active compounds – identification and assessment

Summary

During the last two decades concerns have been raised regarding the possible harmful effects of exposure to certain chemicals (natural and synthetic) that can modulate or disrupt the endocrine system (endocrine disruptors, EDs). Their identification and assessment is complicated by a number of mechanisms on which they act. As a result a variety of *in silico/in vitro/in vivo* methods are used. In this paper the most valuable methods for initial assessment, screening and testing are reviewed. To protect public health, future risk assessment of endocrine disruptors must take into account exposure to the mixtures in which different compounds can interact. The development of fast and sensitive bioassays is crucial to the achievement of this goal.

Keywords: hormonally active compounds, methods *in vitro*, *in vivo*

Zaniepokojenie opinii publicznej obecnością w środowisku związków chemicznych, które mogą zakłócać funkcjonowanie układu hormonalnego (endocrine disruptors, EDs) wynika z udokumentowanych przykładów oddziaływania wielu związków na zwierzęta domowe oraz z wyników badań eksperymentalnych i epidemiologicznych. Ze względu na swoją określoną aktywność biologiczną są one szeroko stosowane jako leki, środki ochrony roślin, dodatki do żywności, wchodzi w skład kosmetyków, środków czystości *etc.* (40). EDs mogą działać na drodze wielu mechanizmów: poprzez aktywację lub blokadę właściwych dla hormonów receptorów mogą odpowiednio naśladować lub hamować działanie naturalnych (endogennych) hormonów; wpływając na aktywność enzymów zaangażowanych w steroidogenezę lub wiążąc się z białkami nośnikowymi mogą mieć wpływ na syntezę, transport, metabolizm lub wydalanie hormonów (35, 43). W rezultacie takie wielokierunkowe oddziaływanie może prowadzić do szeregu schorzeń, stanowiąc duże zagrożenie dla zdrowia publicznego.

Możliwości i ograniczenia badań

Wykrywanie i monitorowanie obecności różnych grup związków w środowisku oraz w żywności jest możliwe dzięki ogromnemu postępowi, jaki dokonał się w zakresie rozwoju metod analitycznych (30). Natomiast ciągle odczuwa się brak metod dla jednoznacznej oceny ich aktywności biologicznej (9, 50). Pocią-

ga to za sobą problemy z oceną ryzyka dla zdrowia człowieka (28, 38, 39). Istniejące metody *in vitro/in vivo*, jakie opracowano na przestrzeni szeregu lat (16, 19, 42), obok określonych możliwości mają także swoje ograniczenia (tab. 1). Ich znajomość jest niezbędna do racjonalnego wykorzystania tych metod (18, 42, 45, 49). W ostatniej dekadzie uwaga świata naukowego i różnych organizacji międzynarodowych skupiała się na weryfikacji, udoskonaleniu i walidacji wybranych metod celem włączenia ich do programów badań nad związkami hormonalnie aktywnymi (9, 10, 22, 32). Mimo pewnych różnic, zarówno w USA, jak i w krajach UE, udało się wypracować kilkupoziomowy schemat postępowania obejmujący kolejno metody o wzrastającej wartości predyktywnej uzyskiwanych z ich udziałem wyników (22, 24). W ogólnym zarysie koncepcja badania według OECD obejmuje: ocenę wstępną – poziom 1, badania skryningowe *in vitro* – poziom 2 i badania *in vivo* – poziom 3, 4 i 5 (tab. 2).

Ocena wstępna jest etapem przygotowawczym i ma na celu określenie zakresu narażenia na dany związek chemiczny, zgromadzenie (na podstawie dostępnego piśmiennictwa) danych na temat jego właściwości fizykochemicznych i toksykologicznych.

Badania skryningowe *in vitro* dostarczają informacji odnośnie do mechanizmu działania badanej substancji.

Do wykrywania substancji estrogennych najbardziej popularne stały się ustalone linie ludzkie raka piersi

Tab. 1. Możliwości i ograniczenia metod *in vitro/in vivo*

Metody	Zalety	Wady i ograniczenia
<i>In vitro</i>	• duża wrażliwość na małe stężenia (> wykrywalność) • duża specyficzność odpowiedzi • możliwość współdziałania z modelami QSAR* • możliwość badania mieszanin (próbek biologicznych) • metody zautomatyzowane (> obiektywność oceny) • możliwość prowadzenia badań przesiewowych • małe ilości substancji do badań (niskie koszty) • ograniczenie użycia zwierząt	• brak ADME** • ryzyko wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych • mogą być jedynie wsparciem (drogowskazem) dla badań <i>in vivo</i>
<i>In vivo</i>	• uwzględniają ADME** co umożliwia ocenę wpływu na cały organizm • obejmują szeroki zakres mechanizmów działania • metody ugruntowane, akceptowane przez organizacje międzynarodowe • oceniane wskaźniki są (mogą być?) przydatne w ocenie ryzyka	Wyniki doświadczeń mogą być modyfikowane przez: • fitoestrogeny zawarte w paszach dla zwierząt laboratoryjnych • endogenne estrogeny

Objaśnienia: * – QSAR, quantity structure activity relationship (charakterystyka ilościowa zależności struktura–powinowactwo);

** – ADME, absorption, distribution, metabolism, excretion (absorpcja, rozmieszczenie, metabolizm, wydalanie)

Tab. 2. Koncepcja badania związków hormonalnie aktywnych wg OECD

Cel	Zakres badań
Poziom 1 selekcja i wybór związków na podstawie istniejących danych	zgromadzenie informacji odnośnie do właściwości fizykochemicznych, zakresu narażenia, danych toksykologicznych
Poziom 2 uzyskanie informacji odnośnie do mechanizmu działania – badania <i>in vitro/in silico</i>	testy wiązania receptora ER, AR, TR, testy aktywacji transkrypcyjnej, wpływ na steroidogenezę i aktywność aromatazy, modelowanie QSAR
Poziom 3* uzyskanie informacji odnośnie do określonego efektu endokrynnego – krótkoterminowe testy <i>in vivo</i>	test wzrostu macicy – aktywność (anty)estrogenna, test Hershbergera – aktywność (anty)androgenna, **test witellogeninowy na rybach
Poziom 4* poznanie wpływu na tarczycę i narządy płciowe	udoskonalony 28-dniowy test toksyczności, testy dojrzewania płciowego – markery dojrzewania, **zmiany histopatologiczne gonad ryb **metamorfiza żab
Poziom 5* badania <i>in vivo</i> obejmujące kompleksową ocenę efektów endokrynnych, zaburzeń reprodukcyjnych etc.	badania 1-/2-pokoleniowe na ssakach **testy reprodukcyjne na płazach, rybach, ptakach

Objaśnienia: * – badania z użyciem zwierząt powinny być wykonywane z przestrzeganiem zasad dobrej praktyki laboratoryjnej i uzyskaniu zgody komisji etycznej; ** – badania ekotoksikologiczne

MCF-7 i T47D (10) oraz raka jajnika BG-1 (11). Jednym z pierwszych modeli do badań substancji o działaniu androgennym była ludzka linia LNCaP, wyizolowana z przerzutów raka gruczołu krokowego (31).

Ilościową ocenę powinowactwa substancji do wyizolowanych z komórek i tkanek receptorów dla estrogenów (ER) lub androgenów (AR) umożliwiają testy wiązania receptora. Nowe rozwiązania, polegające na zastąpieniu technik radiometrycznych polaryzacją fluorescencyjną umożliwiają wprowadzenie znaczników fluorescencyjnych w miejsce izotopowych. Dzięki temu testy wiązania receptora stały się dostępne także dla laboratoriów, w których techniki izotopowe nie mogą być stosowane (42).

Bogatszych informacji w porównaniu z testami wiązania receptora dostarczają testy aktywacji transkrypcyjnej. Pozwalają one ocenić nie tylko zdolność substancji do wiązania z receptorami dla hormonów, ale także wskazują na biologiczne konsekwencje tego wiązania (16). Ich zastosowanie daje możliwość od-

różnienia agonistów od antagonistów. Testy te wykorzystują dobrze poznany, genomowy mechanizm działania hormonów steroidowych, zgodnie z którym aktywacja receptora jądrowego przez hormon reguluje procesy transkrypcyjne, zależne od rodzaju i stężenia liganda oraz czasu i miejsca jego działania (44). Modelem do badań są zmodyfikowane genetycznie komórki eukariotyczne, do których wprowadzono plazmid ekspresji receptora dla hormonu oraz gen reporterowy (42, 44). W obecności związków hormonalnie aktywnych dochodzi do ekspresji genu reporterowego, kodującego białko, które może być łatwo wykrywane i oznaczane

za pomocą metod spektrofotometrycznych, pomiarów fluorescencji lub luminescencji. W roli genów reporterowych wykorzystywane są geny β -galaktozydazy, lucyferazy oraz białka zielonej fluorescencji (green fluorescent protein, GFP) (15, 46, 53). Chociaż podjęto prace nad walidacją kilku spośród wielu dostępnych testów aktywacji transkrypcyjnej, dotychczas tylko jeden, oparty na modyfikowanych genetycznie ludzkich komórkach raka szyjki macicy hER α -HeLa-9903, został włączony w 2009 r. do katalogu metod OECD (8). Na uwagę zasługuje fakt, że testy aktywacji transkrypcyjnej posiadają duży potencjał, jeśli chodzi o wykorzystanie w badaniach aktywności hormonalnej mieszanin (44). W tym zakresie wykorzystywane są m.in. testy oparte na transformowanych szczepach drożdży. O wyborze drożdży jako modelu do badania mieszanin decydują nie tylko niskie koszty, łatwość hodowli i podatność na manipulacje genetyczne, ale przede wszystkim niewielka wrażliwość na obecne w próbkach zanieczyszczenia (53).

Unikalnym modelem *in vitro* badania wpływu ksenobiotyków na produkcję hormonów płciowych jest linia NCI-H295R, wyprowadzona z komórek raka kory nadnerczy człowieka (21). Linia ta posiada fizjologiczne cechy strefowo nieodróżnionych komórek nadnerczy płodu i zdolność do produkcji hormonów, jaką wykazują trzy fenotypowo zróżnicowane strefy kory nadnerczy dorosłych, produkujące mineralokortykosteroidy, glukokortykosteroidy i androgeny. Komórki NCI-H295R posiadają ponadto zdolność ekspresji aromatazy, kluczowego enzymu biosyntezy hormonów steroidowych pozwalającego na konwersję androgenów w estrogeny.

Dla identyfikacji związków interferujących z metabolizmem steroidów używane są testy wiązania receptora Ah. Receptor Ah jest białkiem regulatorowym, które wpływa na ekspresję wielu genów, m.in. dla enzymów zaangażowanych w metabolizm steroidów i wielu ksenobiotyków. Wśród najczęściej stosowanych metod wykrywania agonistów AhR są testy *in vitro* wiązania receptora Ah oraz testy aktywacji transkrypcyjnej AhR. Badania aktywacji transkrypcyjnej receptora Ah najczęściej prowadzi się z użyciem modeli *in vitro* opartych na hodowli komórek hepatomy ludzkiej (HepG2), mysiej (Hepa1c1c7) lub szczurzej (H4IIE). Aktywacja transkrypcyjna AhR mierzona jest pośrednio przez pomiar indukcji enzymów endogennych (np. etoksyrezorufiny-*o*-deetylazy, EROD) lub produktów ekspresji genów reporterowych (np. lucyferaza, GFP) wprowadzonych do DNA komórkowego na drodze transfekcji trwałej lub przejściowej, znajdujących się pod kontrolą promotora zależnego od AhR (13, 23).

Wśród dodatkowych metod wykorzystywanych na tym etapie badań są modele *in silico* (quantitative structure activity relationship, QSAR) pozwalające określić korelację pomiędzy molekularną strukturą związku i skutkami biologicznymi w organizmie człowieka i/lub odpowiednich gatunków ekosystemu (34, 51). Modele takie znajdują zastosowanie najczęściej w ocenie nowych związków, które nie przeszły badań toksyczności i okazały się bardzo ważną metodą w ocenie ryzyka.

Badania *in vivo* wykonywane są w testach krótkoterminowych, które dostarczają danych odnośnie do ukierunkowanego działania endokrynnego – (anty)estrogennego lub (anty)androgennego oraz w badaniach długoterminowych umożliwiających kompleksową ocenę efektów endokrynnych i towarzyszących (25).

Do oceny efektów (anty) estrogennych używany jest test wzrostu macicy (uterotrophic assay) (6), który uznawany jest czasem za złoty standard. Badanie wykonuje się na niedojrzałych lub poddanych ovariectomii, dojrzałych płciowo samicach. Gatunkiem preferowanym jest szczur. Zwierzęta otrzymują (*p.o.* lub *s.c.*) przez 3 kolejne dni badany związek (minimum 2 poziomy dawki). Podstawowym efektem mierzonym jest zmiana masy macicy (świeżej i wysuszonej). Związki estrogenne powodują zwiększenie, anty-

estrogenne – zmniejszenie masy macicy, w porównaniu z odpowiednimi grupami kontrolnymi.

Do wykrywania substancji działających (anty) androgenie przeznaczony jest test Hershbergera (Hershberger assay) (7). Celem wyeliminowania działania endogennych hormonów, badanie wykonuje się na niedojrzałych lub poddanych kastracji dojrzałych samcach szczura. Zwierzęta otrzymują (*p.o.* lub *s.c.*) przez 10 kolejnych dni badany związek (minimum 2 poziomy dawki). Po upływie 24 godzin od ostatniego podania ustala się masę narządów docelowych dla androgenów: gruczołu krokowego, pęcherzyków nasennych, gruczołu opuszkowo-cewkowego, mięśnia opuszkowo-gąbczastego i żołądki przełyka. Związki o działaniu androgennym zwiększają, natomiast antyandrogeny – zmniejszają masę wymienionych narządów. Wynik uznaje się za pozytywny przy istotnej zmianie masy przynajmniej 2 narządów.

Ze względu na fakt, że wyniki uzyskiwane na zwierzętach młodych i dojrzałych poddawanych kastracji są porównywalne, coraz częściej rezygnuje się z wersji badania na zwierzętach kastrowanych. Pozwala to na uniknięcie zabiegów przysparzających bólu, co pozostaje w zgodzie z dążeniem do humanitarnego traktowania zwierząt doświadczalnych. Należy jednak pamiętać, że wykonanie badania z użyciem młodych (niedojrzałych) zwierząt wymaga dużo większych umiejętności i precyzji przy wykonywaniu zabiegów. Nadmienić przy tym trzeba, że zgodnie z wytycznymi OECD oba testy wykonywane są najczęściej na szczurach, ale istnieją poważne dowody naukowe, że doskonałym modelem do badań nad związkami endokrynnie czynnymi jest chomik złocisty (*Mesocricetus auratus*) (29). Zwierzę to posiada unikatowe cechy reprodukcyjne, takie jak: szybko osiąganą dojrzałość płciową (6 tygodni), krótki okres ciąży (16 dni), dużą liczebność miotu, rzadko występujące wady spontaniczne u płodów oraz dużą wrażliwość układu rozrodczego na czynniki toksyczne.

Do wykrywania związków oddziałujących na gonady i tarczycę przeznaczony jest 28-dniowy test toksyczności, którego udoskonalona wersja została rozszerzona o ocenę dodatkowych wskaźników uzyskiwanych w badaniach histopatologicznych wybranych narządów docelowych, badanie plemników i cyklu rurowego oraz pomiary poziomu hormonów tarczycy (3).

Badaniem mającym na celu m.in. wykrycie związków oddziałujących na hormony tarczycy jest 20-dniowy test dojrzewania płciowego samic i 21-dniowy test dojrzewania samców (18). Ważnymi wskaźnikami podlegającymi ocenie są w nich: ustalenie terminu otwarcia pochwy i pojawienia się pierwszej rui u samic oraz wiek, w którym ma miejsce oddzielenie napletka. U samców określa się dodatkowo poziom hormonów (T4 i TSH) w surowicy oraz masę pęcherzyków nasennych z gruczołami koagulującymi, gruczołu krokowego, jąder, najądrzy, tarczycy, przysadki, wątroby, nerek i nadnerczy. Wybrane narządy (w tym m.in. tar-

czyca, przysadka, jądra) poddawane są ocenie histopatologicznej.

Najwięcej informacji dostarczają badania długoterminowe na gryzoniach (1, 2, 4, 5). Ze względu na fakt, że ekspozycja na badany czynnik obejmuje wszystkie etapy cyklu reprodukcyjnego (badania jedno- i wielopokoleniowe), możliwa jest ocena wpływu na oogenezę i spermatogenezę, zapłodnienie, śmiertelność pre- i postnatalną, płodność i plenność, rozwój prenatalny (w tym działanie teratogenne), zaburzenia behawioralne u potomstwa, wiek osiągnięcia dojrzałości płciowej, cykliczność pojawiania się rui i zachowania seksualne, okres starzenia się układu rozrodczego oraz zmiany histopatologiczne w obrębie narządów płciowych, zarówno u osobników żeńskich, jak i męskich.

Znaczenie badań eksperymentalnych w ocenie ryzyka dla zdrowia

Badania *in vitro* umożliwiają poznanie mechanizmu działania badanej substancji i mogą być przydatne na etapie identyfikacji i charakterystyki zagrożenia (14).

Badania *in vivo* posiadają dwa aspekty: ilościowy, który ma na celu ustalenie, w jakim stopniu uzyskane na zwierzętach wyniki badań toksyczności pozwalają na wyliczenie bezpiecznej dawki dla człowieka; jakościowy, który jest próbą udzielenia odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu stwierdzone u zwierząt reakcje niepożądane mogą wystąpić u ludzi.

W ocenie ilościowej dąży się do ustalenia najwyższej dawki, po której nie obserwuje się objawów szkodliwego oddziaływania badanej substancji (no observed adverse effect level, NOAEL) i dawki najniższej powodującej dające się zauważyć efekty toksyczne (lowest observed adverse effect level, LOAEL). Po zastosowaniu odpowiednich współczynników bezpieczeństwa, podyktowanych różnicami gatunkowymi, rodzajem i czasem narażenia, niepewnością wynikającą z ekstrapolacji wyników ze zwierząt na człowieka *etc.* służą one do wyznaczenia dopuszczalnych wartości dziennego pobrania dla człowieka. Jednak w przypadku związków hormonalnie aktywnych (podobnie jak w odniesieniu do związków mutagennych) przydatność wspomnianych wskaźników budzi wiele kontrowersji. Amerykańską alternatywą dla NOAEL/LOAEL jest zaproponowana w 1984 r. tzw. dawka wyznaczająca (benchmark dose, BMD), w której punkt wyjścia (point of departure, POD) oparty jest na krzywych dawka–odpowiedź wyznaczonych dla najbardziej wrażliwych wskaźników (endpoints) istotnych w ocenie ryzyka dla zdrowia człowieka (47).

W ocenie jakościowej ważną rolę spełniają biomarkery (26). Biomarkery są to mierzalne zmiany w organizmie i zachodzących w nim procesach biochemicznych wywołane przez wchłonięty ksenobiotyk. Na ich podstawie można uzyskać odpowiedzi na trzy podstawowe pytania:

– czy organizm był narażony na działanie czynnika szkodliwego (biomarkery ekspozycji);

– czy narażenie spowodowało skutki zdrowotne (biomarkery efektu);

– czy osobnik jest wrażliwy na działanie danego związku (biomarkery wrażliwości).

Przykładowym biomarkerem ekspozycji na estrogeny jest indukowanie witellogeniny u samców ryb (białko to w normalnych warunkach jest obecne tylko u samic) (36). Z kolei zmiana aktywności enzymu mikrosomalnego, etoksyrezozyfyny (ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD), jest wskaźnikiem narażenia na związki halogenowe węglowodorów aromatycznych (WWA) i związki dioksynopodobne (52). W badaniach tych modelowymi gatunkami ryb są: karp, zębacz kanałowy i płotka, a ocenie podlegają najczęściej próbki środowiskowe, takie jak woda i ścieki (33).

Do markerów efektu działania EDs zaliczyć można m.in. wskaźniki oceniane we wspomnianych wcześniej badaniach na zwierzętach np. zmiana masy macicy pod wpływem (anty)estrogenów. U ludzi najbardziej prawdopodobnym objawem narażenia na EDs wydają się zaburzenia męskiego układu rozrodczego (testicular dysgenesis syndrome, TDS) obejmujące nieprawidłowe ujście zewnętrzne cewki moczowej (*hypospadiasis*), wnetrostwo (*cryptorchismus*), oligo-(azo)-spermie i/lub nowotwory jąder (12).

Podsumowanie

Ze względu na fakt, że badania pojedynczych związków nie odzwierciedlają sytuacji rzeczywistego narażenia człowieka, coraz częściej zwraca się uwagę na potrzebę badania mieszanin (20, 27, 41). Eksperymentalnie wykazano, że kombinacja EDs może powodować istotne zmiany, nawet wówczas gdy poszczególne związki występują w niewielkich stężeniach, indywidualnie nie wykazujących zauważalnych efektów (37, 48). Dotyczy to zwłaszcza mieszanin charakteryzujących się wspólnym mechanizmem działania (mode of action, MOA).

Wydaje się zatem, że z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego nowym wyzwaniem przy szacowaniu ryzyka jest ocena skumulowanego narażenia na związki biologicznie aktywne obecne w środkach spożywczych (17). Dobrym rozwiązaniem okazują się biotesty, w których dokonuje się pomiaru aktywności biologicznej wyrażającej sumaryczne obciążenie próbek.

Piśmiennictwo

1. Anon.: (1983) OECD TG 415 One-Generation Reproduction Toxicity Study.
2. Anon.: (1983) OECD TG 416 Two-Generation Reproduction Toxicity Study (updated 2001).
3. Anon.: (1995) OECD TG 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. (Enhanced: updated 2008).
4. Anon.: (1995) OECD TG 421 Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test.
5. Anon.: (1996) OECD TG 422 Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test.
6. Anon.: (2007) OECD TG 440: Uterotrophic bioassay in rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.
7. Anon.: (2009) OECD TG 441: Hershberger bioassay in rats. A short-term screening assay for (anti) androgenic properties.

8. Anon.: (2009) OECD TG 455: Stably transfected human estrogen receptor- α transcriptional activation assay for detection of estrogenic agonist-activity of chemicals.
9. Ashby J.: Scientific issues associated with the validation of in vitro and in vivo methods for assessing endocrine disrupting chemicals. *Toxicology* 2002, 181-182, 389-397.
10. Baker V. A.: Endocrine disruptors – testing strategies to assess human hazard. *Toxicol. in Vitro* 2001, 15, 413-419.
11. Baldwin W. S., Curtis S. W., Caulhen C. A., Risinger J. I., Korach K. S., Barrett J. C.: BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 1998, 34, 649-654.
12. Bay K., Asklund C., Skakkebaek N. E., Andersson A.-M.: Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disruptors. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, 20, 77-90.
13. Behnisch P. A., Hosoe K., Sakai S.: Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds – a review of bioassay/biomarker technology. *Environ. Internat.* 2001, 27, 413-439.
14. Blaauw B. J.: The applicability of in vitro-derived data in hazard identification and characterisation of chemicals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2002, 11, 213-225.
15. Bovee T. F. H., Helsdingen R. J. R., Koks P. D., Kuiper H. A., Hoogenboom R. L. A. P., Keijer J.: Development of rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004, 325, 187-200.
16. Charles G. D.: In vitro models in endocrine disruptor screening. *ILAR J.* 2004, 45, 491-501.
17. Charles G. D., Linscombe V. A., Tornesi B., Matson 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.
18. Clode S. A.: Assessment of in vivo assays for endocrine disruption. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, 20, 35-43.
19. Diel P., Schmidt S., Vollmer G.: In vivo systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *J. Chromatogr. B* 2002, 777, 191-202.
20. Filby A. L., Neuparth T., Thorpe K. L., Owen R., Galloway T. S., Tyler C. R.: Health impact of estrogens in the environment, considering complex mixture effects. *Environ. Health Perspect.* 2007, 115, 1704-1710.
21. Gazdar A., Oie H., Shackleton C., Chen T., Triche T., Myers C., Chrousos G., Brennan M., Stein C., La Rocca R.: Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* 1990, 50, 5488-5496.
22. Gelbke H. P., Kayser M., Poole A.: OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 2004, 205, 17-25.
23. Giesy J. P., Hilscherova K., Jones P. D., Kannan K., Machala M.: Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Marine Pollution Bull.* 2002, 45, 3-16.
24. Gray L. E., Kelce W. R., Wiese T. et al.: Endocrine screening methods workshop report: detection of estrogenic and androgenic hormonal and anti-hormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reprod. Toxicol.* 1997, 11, 719-750.
25. Gray L. E. Jr., Foster P. M. D.: Significance of experimental studies for assessing adverse effects of endocrine-disrupting chemicals. *Pure Appl. Chem.* 2003, 75, 2125-2141.
26. Greim H.: Endpoints and surrogates for use in population studies in toxicology. *Toxicol. Lett.* 2001, 120, 395-403.
27. Groten J. P., Heijne W. H. M., Stierum R. H., Freidig A. P., Feron V.: Toxicology of chemical mixtures: a challenging quest along empirical sciences. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2004, 18, 185-192.
28. Harvey P. W., Everett D. J.: Regulation of endocrine-disrupting chemicals: Critical overview and deficiencies in toxicology and risk assessment for human health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, 20, 145-165.
29. Hendry W. J. III, Sheehan D. M., Khan S. A., May J. V.: Developing a laboratory animal model for perinatal endocrine disruption: the hamster chronicles. *Exp. Biol. Med.* 2002, 227, 709-723.
30. Holland P. T.: Analysis of endocrine active substances in food and the environment. *Pure Appl. Chem.* 2003, 75, 1843-1857.
31. Horoszewicz J. S., Leong S. S., Chu T. M., Wajsman Z. L., Friedman M., Papsidero L., Kim U., Chai L. S., Kakati S., Arya S. K., Sandberg A. A.: The LNCaP cell line a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1980, 37, 115-132.
32. Huet M.-C.: OECD Activity on endocrine disruptors test guidelines development. *Ecotoxicology* 2000, 9, 77-84.
33. Hutchinson T. H., Ankley G. T., Segner H., Tyler C. R.: Screening and testing for endocrine disruption in fish – biomarkers as „signposts” not „traffic lights” in risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 2006, 114, 106-114.
34. Jacobs M. N.: In silico tools to aid risk assessment of endocrine disrupting chemicals. *Toxicology* 2004, 205, 43-53.
35. Janosek J., Hilscherová, Bláha L., Holoubek I.: Environmental xenobiotics and nuclear receptors- Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicol. in Vitro* 2006, 20, 18-37.
36. Jones P. D., De Coen W. M., Tremblay L., Giesy J. P.: Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Water Sci. Technol.* 2000, 42, 1-14.
37. Kortenkamp A.: Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 2007, 115, 98-105.
38. Martin O. V., Lester J. N., Voulvoulis N., Boobis A. R.: Human health and endocrine disruption: a simple multicriteria frame work for qualitative assessment of end point-specific risks in context of scientific uncertainty. *Toxicol. Sci.* 2007, 98, 332-347.
39. Mendes J. J. A.: The endocrine disruptors: a major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* 2002, 40, 781-788.
40. Minta M., Stypula-Trębas S.: Związki hormonalnie aktywne w środowisku a zagrożenia zdrowia publicznego. *Medycyna Wet.* 2010, 66, 525-529.
41. Monosson E.: Chemical mixtures: considering the evolution of toxicology and chemical assessment. *Environ. Health Perspect.* 2005, 113, 383-390.
42. Mueller S. O.: Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and anti-estrogenic activity of phytoestrogens. *J. Chromatogr. B* 2002, 777, 155-165.
43. Rosselli M., Reinhart K., Imthurn B., Keller P. J., Dubey R. K.: Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Hum. Reprod. Update* 2000, 6, 332-350.
44. Roy P., Alevizaki M., Huhtaniemi I.: In vitro bioassays for androgens and their diagnostic applications. *Hum. Reprod. Update* 2008, 14, 73-82.
45. Saarinen N. M., Lorenzetti B. S., Mortensen A., Mäkelä S., Penttinen P., Sørensen I. K., Valsta L. M., Virgili F., Vollmer G., Wärri I. A., Zierau O.: Tools to evaluate estrogenic potency of dietary phytoestrogens: a consensus paper from the EU thematic network „Ohytohelth” (QLKI-2002-2453). *Genes Nutr.* 2006, 1, 143-158.
46. Sanseverino J., Elridge M. L., Layton A. C., Easter J. P., Yarbrough J., Schultz T. W., Saylor G. S.: Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. *Toxicol. Sci.* 2009, 107, 122-134.
47. Setzer R. W. Jr., Kimmel C. A.: Use of NOAEL, benchmark dose, and other models for human risk assessment of hormonally active substances. *Pure Appl. Chem.* 2003, 75, 2151-2158.
48. Silva E., Rajapakse N., Kortenkamp A.: Something from „nothing” – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 1751-1756.
49. Soto A. M., Maffini M. V., Schaeberle C. M., Sonnenschein C.: Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, 20, 15-33.
50. Spearow J. L., Barkley M.: Reassessment of models used to test xenobiotics for oestrogenic potency is overdue. *Hum. Reprod.* 2001, 16, 1027-1029.
51. Walker J. D.: Application of QSARs in toxicology: a US Government perspective. *J. Molec. Struct. (Theochem)* 2003, 622, 167-184.
52. Whyte J. J., Jung R. E., Schmitt C. J., Tillitt D. E.: Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 2000, 30, 347-370.
53. Witters H. E., Vangenechten C., Berckmans P.: Detection of estrogenic activity in Flemish surface waters using an in vitro recombinant assay with yeast cells. *Water Sci. Technol.* 2001, 43, 117-123.

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