

# PRACE POGLĄDOWE

Mirosław J. Stasik

## 4-CHLORO-O-TOLUIDYNA: ETIOLOGICZNY CZYNNIK INDUKCJI RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO, HISTORIA JEDNEGO ODKRYCIA

4-CHLORO-O-TOLUIDINE: AN ETIOLOGICAL AGENT IN THE INDUCTION OF URINARY BLADDER CANCER, HISTORY OF A DISCOVERY

Z Institut für Arbeits, Sozial- und Umweltmedizin  
der Johannes Gutenberg Universität  
Mainz, Niemcy

**STRESZCZENIE** Wbrew obowiązującej naukowej tezie o rakotwórczym działaniu wyłącznie wielopierścieniowych amin aromatycznych na pęcherz moczowy człowieka, udało się wykazać, w badaniu kohortowym, że również prosta, jednopierścieniowa aryloamina – 4-chloro-orto-toluidyna (4-COT) – surowiec do syntezy barwników, pigmentów i pestycydu chlordimeformu – indukuje raka pęcherza moczowego.

W badaniu tym wykazano osiem zachorowań na raka pęcherza wśród 116 mężczyzn, narażonych na 4-COT stanowiących subkhortę. Każdy z tych ośmiu robotników zatrudniony był w zakładzie produkcji 4-COT przed 1970 r., zanim przeprowadzono tam poprawę warunków higienicznych pracy. Ten względnie wyższy poziom narażenia na 4-COT wynosił średnio 14 lat, a przeciętny okres utajenia 27,5 lat. Standaryzowany wskaźnik zachorowań (SIR) był 72,7-krotnie wyższy (95% CI: 31,4–143,3) niż oczekiwany. Do 2000 r. liczba zachorowań na raka pęcherza w subkhortcie wzrosła do 12, co stanowi 12,3% jej członków.

Rakotwórczość u zwierząt doświadczalnych, genotoksyczność, jak również wiązania kowalencyjne tej aryloaminy z DNA wątroby zwierząt zostały wykazane wcześniej.

Objawem wiodącym ostrego zatrucia 4-COT jest krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego, które wydaje się stanem przedrakowym.

Opierając się na wynikach badań, eksperci DFG (1988) i IARC (1990) uznali, że 4-COT jest kancerogenem dla człowieka i prawdopodobnym kancerogenem, odpowiednio. W większości krajów zaniechano produkcji 4-COT. Med. Pr. 2003; 54 (4): 355–359

**SŁOWA KLUCZOWE:** rak pęcherza moczowego, jednopierścieniowa amina aromatyczna, wiązanie kowalencyjne 4-COT-DNA, fenotypy acetylacji, krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego

**ABSTRACT** Despite a well established scientific thesis on the exclusive cancerogenic effect of polycyclic aromatic amines on urinary bladder of man, we succeeded to demonstrate in a cohort study that simple, monocyclic aromatic amin, 4-chloro-o-toluidine (4-COT) – an intermediate for the manufacture of dyestuffs, pigments and of chlordimeform, a pesticide – also induces urinary bladder cancer.

Our study revealed urothelial carcinomas in 8 of 116 4-COT exposed workers who formed a sub-cohort. All the eight workers had been employed in the 4-COT production plant before industrial hygiene improvements were introduced in 1970. This presumably higher level of 4-COT exposure lasted for 14 year (median). The latency period lasted for 27.5 years (median). The standardized incidence rate for urothelial carcinomas in the 4-COT sub-cohort was 72.7 times higher (95% CI: 31.4–143.3) than expected.

Until 2000, a sub-cohort incidence increased to 12 bladder cancers (12.3%).

4-COT becomes covalently bound to the DNA of mice and rats' livers. Its genotoxic and carcinogenic effects in animals have been described earlier.

Hemorrhagic cystitis is a main finding of 4-COT acute poisoning, which can be considered as a precancerous state.

Based on our study results, the DFG and IARC experts classified 4-COT as carcinogenic to humans (1988) carcinogen and probably carcinogenic to human (1990), respectively. The commercial production of 4-COT discontinued in majority of countries (EPA, 1988). Med Pr 2003; 54 (4): 355–359

**KEY WORDS:** urothelial carcinoma, monocyclic aromatic amine, covalent binding 4-COT-DNA, N-acetylation phenotypes, haemorrhagic cystitis

Nadesłano: 24.04.2003

Zatwierdzono: 23.06.2003

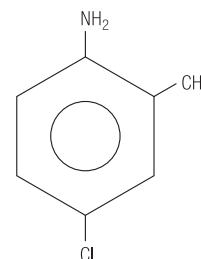
Adres autora: Kranichweg 2, D-65527 Niedernhausen, Germany, e-mail: stasik@mail.uni-mainz.de

© 2003, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

Obowiązująca przez wiele lat naukowa teza opierająca się na pionierskich badaniach doświadczalnych Huepera i wsp. (1), wynikach epidemiologicznych studiów Case i wsp. (2), jak również na pracach Melicka i wsp. (3) zakładała, że zawodowy rak pęcherza moczowego może zostać wywołany jedynie przez wielopierścieniowe aminy aromatyczne (2-naftyloamina, benzydyna i 4-aminofenol) (4). Innych kancerogenów wśród amin aromatycznych najpierw nie wykryto.

W końcu lat 80. udało się wykazać, że również prosta, jednopierścieniowa amina aromatyczna 4-chloro-o-toluidyna (4-COT) (ryc. 1) wywołuje raka pęcherza moczowego u człowieka (5), co nadal intryguje naukę, o czym świadczy kolejna

monografia wydana na ten temat przez International Agency for Research on Cancer (IARC) w 2000 r. (6).



Ryc. 1. Wzór aminy aromatycznej 4-chloro-o-toluidyny (4-COT).

## ZASTOSOWANIE 4-COT W PRZEMYŚLE I ROLNICTWIE

Zsyntetyzowana w 1870 r. przez Beilsteina i Kuhlberga 4-chloro-o-toluidyna (4-COT) rozpoczęła swą „karierę” w okresie międzywojennym od barwnika tekstylnego, zachwycając odbiorców odcieniem swej lekkiej, pięknej czerwieni (Fast Red TR, Ehtrot TR Base). Z wolnej 4-COT i jej chlorowodoru wytwarzano również barwniki azowe dla bawełny, jedwabiu i nylonu, a także stanowiła produkt wyjściowy dla pigmentów np. Red 7 czy Yellow 49. Dzięki tym właściwościom 4-COT znalazła szybko drogę do hal produkcyjnych Anglii, Niemiec, Szwajcarii, Włoch, Japonii i USA (7).

W wyniku reakcji 4-COT z dimetyloformamidem otrzymano w 1966 r. pestycyd – chlordimeform. Szczyt kariery 4-COT przypadł na lata siedemdziesiąte, kiedy na skalę przemysłową zastosowano ją do syntezy tego pestycydu w wielu krajach.

Tutaj należy podkreślić szczególną cechę metabolizmu chlordimeformu, który, niezależnie czy był zsyntetyzowany z 4-chloro-o-toluidyny, czy też z o-toluidyny\* – zawsze metabolizował do swego głównego metabolitu 4-COT – zarówno u człowieka, jak również u zwierząt i roślin.

Chlordimeform, ówczesnie insektycyd najnowszej generacji, wykazywał nie tylko szerokie właściwości owadobójcze, lecz również unicestwiał postaci larwalne i jaja owadów. Szczególne zastosowanie znalazł jako akarycyd zwalczający roztocze (Acari) o wielkości poniżej 1 mm, których jest 10 000 gatunków, w tym roślinożernych oraz kleszcze, będące plagą dla farmerów i hodowców. Dzięki tym właściwościom chlordimeform został uznany za dobrodziejstwo dla pól uprawnych, potęgując ich plony i błyskawicznie rozprzestrzenił się na obu półkulach. I tak, kiedy w Europie był stosowany głównie do zwalczania szkodników w uprawach owoców, warzyw i winorośli, to w obu Amerykach, Azji i Australii okazał się niezastąpiony w ochronie plantacji bawełny, pól ryżu i ochrony bydła przed insektami (8,9).

Po ogłoszeniu wyników prowadzonych badań (5), według danych US Environmental Protection Agency, produkcja 4-COT została zaniechana w większości krajów (10), a Food and Agriculture Organization (FAO) zaleciła zaprzestanie stosowania chlordimeformu tam, gdzie w produktach żywnościowych mogłyby wystąpić pozostałości jego metabolitu – 4-COT (11). W Chinach produkowano chlordimeform jeszcze w 1999 r. (6).

## KINETYKA I METABOLIZM

Półokres wydalania 4-COT po podaniu i.p. wyniósł 16,5 godzin (12). W moczu wykazano dwa metabolity tej aryloaminy: kwas 5-chloroantranilowy i 4-chloro-2-metyloacetanilid. 4-COT i jej metabolity ulegają koniugacji do glikuronidów i siarczanów (13,14), a Hillowi i wsp. z Southern Research Institute w Alabamie udało się zidentyfikować *in vitro* dwa mikrosomalne metabolity 4-COT: 5-chloro-2N-hydroksyloaminotoluen i 4,4-dichloro-2,2-dimetyloazobenzen (15).

\* W Szwajcarii wytwarzano chlordimeform również z o-toluidyny.

Obecność pierwszego z nich potwierdziła zgodność z aktualnym poglądem o chemicznej kancerogenezie (16,17). Bentley i wsp. z Bazylei stwierdzili, że (<sup>14</sup>C) 4-COT wiąże się kowalencyjnie z DNA, RNA i białkiem komórek wątroby myszy i szczura (18). Wskaźnik kowalencyjny z DNA dla 4-COT według W.K. Lutza z Uniwersytetu w Zurichu wyniósł 220 jednostek (19), tyle co dla benzydyny, a tylko 14,2 jednostki dla aniliny (20,21). Ta aryloamina wiąże się również z hemoglobina szczura (22).

## DZIAŁANIE TOKSYCZNE

### Badania *in vitro*

Czysty 4-COT jest mutagenny dla *Salmonella typhimurium* TA 1535 (22), natomiast 4-COT-HCl działa mutagennie na *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100 po aktywacji metabolicznej (23,24), a dla różnych szczepów *Escherichia coli* jest silnie mutagenny bez aktywacji metabolicznej (25).

Doustne dawki 200 mg/kg 4-COT hamują u myszy testikularną syntezę DNA i tylko 25% <sup>3</sup>H-tymidyny zostaje wykorzystana (26).

### Doświadczenia na zwierzętach

W doświadczeniu na toksyczność ostrą po podaniu 4-COT i.p. DL<sub>50</sub> dla myszy (samce, samice) wyniosła odpowiednio 720 i 680 mg/kg, a dla szczura (samce, samice) wyniosła odpowiednio 560 i 700 mg/kg.

W długookresowych badaniach, przeprowadzonych w National Cancer Institute (Bethesda), 4-COT podawana z pokarmem indukowała u myszy obojga płci nowotwory: hemangiosarkoma i hemangioma – głównie w śledzionie i tkance tłuszczowej (27–29). U szczurów natomiast wystąpiły jedynie łagodne nowotwory wątroby (23).

### Działanie toksyczne na ludzi

Ostre zatrucia występowały przede wszystkim u robotników zatrudnionych w produkcji 4-COT lub jej przetwarzaniu. Najczęstszą ich przyczyną było ignorowanie zasad higieny lub awaria urządzeń przemysłowych. Zwracało uwagę, że już jednorazowa, krótka ekspozycja na wyższe stężenie 4-COT przez skórę i drogi oddechowe prowadziła do wystąpienia zatrucia.

Klinicznie dominowały objawy z dróg moczowych z mikroskopową lub makroskopową hematurią. Często właśnie krwiomocz był pierwszym objawem zatrucia. Później występowały: bolesny częstomocz, bóle w podbrzuszu, jak również obserwowano zmniejszoną pojemność pęcherza moczowego (30–35). U ponad 90% przypadków obserwowanych przez autora endoskopowo stwierdzono krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego z owrzodzeniami, martwicą i krwawieniem (35). Pierwsze sześć przypadków opisał Lyons (31), a trzy inne opisane przypadki potwierdzone zostały biopsją (32). Stąd uważa się, że krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego jest wiodącym objawem ostrego zatrucia 4-COT.

Methemoglobinemia z sinicą – typowy objaw zatrucia innymi aminami aromatycznymi – stwierdzony został w połowie badanych przypadków zatruc (35).

Stężenia 4-COT w moczu wynosiły u trzech robotników w 3 dni po ekspozycji 1,25; 3,75; 4,16 mg/l (32), u dwóch innych robotników 12 i 48 godzin po ekspozycji 1,7 i 2,1 mg/l (35).

## **DZIAŁANIE RAKOTWÓRCZE – WYNIKI BADAŃ EPIDEMIOLOGICZNYCH**

Wyjaśnienie uzasadnionego podejrzenia, że 4-COT posiada również potencjał rakotwórczy dla człowieka mogły dostarczyć tylko analityczne badania epidemiologiczne. Kancerogenne działanie 4-COT badano już wcześniej w dwóch epidemiologicznych studiach w Szwajcarii i USA i wykazano w nich zwiększoną umieralność z powodu złośliwych nowotworów układu trawiennego i oddechowego (36,37). W obu badaniach nie stwierdzono zwiększonego ryzyka raka pęcherza moczowego.

Również w prowadzonym przez autora wspólnie z Lange z Uniwersytetu w Monachium badaniu umieralności, obejmującym historyczną kohortę 335 robotników (mężczyzn) z rejonu Frankfurtu n. Menem, którzy w latach 1929–1982 zatrudnieni byli przy produkcji i przetwarzaniu 4-COT, nie stwierdzono najpierw żadnego przypadku zgonu z powodu raka pęcherza moczowego, lecz pięć zgonów z powodu złośliwych nowotworów o innej lokalizacji (38). Sądzono nawet, że udało się rozwiać obawy o raku pęcherza indukowanym przez 4-COT. Te pięć zgonów wystąpiło w grupie 116 robotników, którzy pracowali w zakładzie produkcyjnym 4-COT przed 1970 r., kiedy panowały tam gorsze warunki higieny pracy i względnie wyższe stężenia 4-COT.

Do przelomu w prowadzonym badaniu doszło później, kiedy autor ograniczył „follow up study” do tej właśnie grupy 116 robotników (subkohorta), zatrudnionych w zakładzie produkcji 4-COT przed rokiem 1970, tj. przed poprawą warunków higieny pracy. W tej subkohorcie, między styczniem 1983 r. a czerwcem 1986 r., wystąpiło osiem zachorowań na raka pęcherza moczowego, przy czym dwóch chorych zmarło w międzyczasie (5). Tych ośmiu chorych na raka pęcherza narażonych było przed rokiem 1970 na relatywnie wysokie stężenia 4-COT od 1,5 do 20 lat (mediana 14 lat). Dwaj z nich przebyli indukowane przez 4-COT krwotoczne zapalenie pęcherza na 4 i 14 lat przed wystąpieniem raka pęcherza. Currie opisał podobny przypadek raka w trzy lata po ostrym zatruciu 4-COT (30). Obliczony okres utajenia u tych ośmiu pacjentów wynosił 17–38 lat (mediana 27,5). Badaniem histopatologicznym wykazano, że wszystkie guzy złośliwe pęcherza, poza jednym, były brodawkowatymi rakami urotelialnymi (39). Spośród sześciu pacjentów, u których udało się określić szybkość N-acetylacji, u czterech stwierdzono fenotyp wolnej acetylacji (40–42). Nawyk palenia papierosów dotyczył dwóch chorych, trzech nie palili, jeden zaniechał palenia, a u pozostałych dwóch – brak było danych (43). Standaryzowany wskaźnik zachorowalności

(SIR) dla raków pęcherza moczowego w subkohorcie, przy wartości oczekiwanej 0,11 był 72,7-krotnie wyższy (95% CI: 31,4–143,3) i odpowiadał wskaźnikom zachorowalności, stwierdzonym przy narażeniu na akryloaminy uznane już za rakotwórcze (1–3).

Eksperti Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), opierając się na wynikach opisanego wyżej badania uznali 4-COT za substancję rakotwórczą dla człowieka (A1) (44). Po raz pierwszy stwierdzono, że ta prosta, jednopierścieniowa, przemysłowa aryloamina jest czynnikiem etiologicznym w indukcji raka pęcherza moczowego, a wydane zalecenia dotyczyły zakazu jej wytwarzania, przetwarzania i użycia. Podobnie zakwalifikowano tę aryloaminę w Szwajcarii i w Finlandii (6). Natomiast ocena ekspertów IARC brzmiała: „4-COT jest czynnikiem prawdopodobnie rakotwórczym dla ludzi (grupa 2A)” (7).

Xue i współpracownicy z Uniwersytetu w Szanghaju wykazali, że w badaniach kohortowych, obejmujących 8732 robotników rolnych, narażonych na chlordimeform podczas upraw ryżu i bawełny w Chinach, standaryzowany wskaźnik zgonów z powodu raka pęcherza moczowego wynosił 2,65 i 4,20 odpowiednio dla mężczyzn i kobiet. W moczu robotników stwierdzono wcześniej chlordimeform i główny jego metabolit 4-COT (45,46).

Zespół badawczy Norportha z Uniwersytetu w Essen odnotował w fabryce w Dolnej Saksonii siedem przypadków raka pęcherza moczowego (liczba przypadków oczekiwanych – 0,13) wśród grupy 49 robotników, syntetyzujących chlordimeform z 4-COT. SIR wyniósł 53,8 (47,48). Norporth w swym podręczniku medycyny (s. 165), wpisał odkrywcę rakotwórczości 4-COT w poczet 15 badaczy, którzy na przestrzeni ponad dwóch wieków odkryli zawodowe substancje rakotwórcze: od Percivalla Potta (1775) przez Rehna (1895) i Creecha, Johnsona (1974) do Stasika (1987) (49), jedyne Polaka w tym światowym gronie.

Boyle i Macferlane (1997) obserwowali zachorowania na raka pęcherza w historycznej kohorcie 847 osób narażonych na 4-COT przy produkcji chlordimeformu w czterech krajach: Szwajcarii, USA, W. Brytanii i Australii. Stwierdzono 10 zachorowań w kohorcie na raka pęcherza moczowego (oczekiwano 2,63). SIR wyniósł 3,8; przy czym w samej tylko Szwajcarii wykazano cztery zachorowania (oczekiwano 0,72), a SIR równał się 5,6 (9).

### **Późniejsze badania własne**

Prześledzono losy wspomnianych wcześniej robotników, którzy przebyli ostre krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego; dwudziestu trzech po przebyciu ostrego zatrucia 4-COT, a dwóch po ostrym zatruciu chlordimeformem. Po średnio 11,5 lat trwającej latencji stwierdzono w tej 25-osobowej grupie cztery przypadki zachorowania na raka pęcherza moczowego. Przedstawiając te wyniki na kongresie onkologicznym w 1994 r. w Hamburgu została wysunięta hipoteza, że ostre krwotoczne zapalenie pęcherza spowodowane 4-COT jest stanem przedrakowym (50).

Zdefiniowana w 1983 r., 116-osobowa subkohorta 4-COT okazała się cennym instrumentem badawczym. Późniejsze, drugie 10-letnie „follow up study” wykazało, że liczba zachorowań na raka pęcherza moczowego wzrosła w niej do 12, co oznaczało, że zachorowało 12,3% członków tej subkohorty. Te dane m.in. zostały przedstawione na kongresie ICOH 2000 w Singapurze (51).

I tak dobiegła końca historia o 4-COT, z którą długo łączono nadzieję w przemyśle i rolnictwie. Lecz późniejsze studia i obserwacje tej aryloaminy dostarczyły ewidentnych dowodów o jej dwulicowym, rozdwojonym działaniu, z wyraźną przewagą efektów szkodliwych nad pożytecznymi. Nakazem chwili stało się zatem wyeliminowanie 4-COT ze środowiska człowieka.

## PIŚMIENNICTWO

- Hueper W.S., Wiley F.H., Wolfe H.D.: Experimental production of bladder tumors in dogs by administration of  $\beta$ -naphthylamine. *J. Ind. Hyg.* 1938; 20: 46-84.
- Case R.A.M., Hosker M.E., McDonald D.B., Pearson J.T.: Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. *Br. J. Ind. Med.* 1954; 11: 75-104.
- Melick W.F., Escue H.M., Naryka J.J., Mezera R.A., Wheeler E.P.: The first reported cases of human bladder tumors due to a new carcinogen - xenylamine. *J. Urol. (Balt)* 1955; 74: 760-766.
- Clayson D.B.: *Chemical Carcinogenesis*. Little Brown and Co., Boston 1962.
- Stasik M.J.: Carcinomas of the urinary bladder in a 4-chloro-o-toluidine cohort. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1988; 60: 21-24.
- International Agency for Research on Cancer: *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Tom 77. IARC, Lyon 2000.
- International Agency for Research on Cancer: *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans*. Tom 48. IARC, Lyon 1990.
- International Agency for Research on Cancer: *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans*. Tom 30. IARC, Lyon 1983.
- Environmental Health Criteria. Tom 199. Chlordimeform. WHO, Geneva 1998.
- Environmental Protection Agency: Benzenamine, 4-chloro-2-methyl; benzenamine, 4-chloro-2-methyl, hydrochloride; benzenamine, 2-chloro-6-methyl; proposed significant new use of chemical substances. *Fed. Registr.* 1988; 53: 36076-36080.
- FAO/WHO Report: Pesticide residues in food 1987. FAO, WHO, Rome 1987.
- Holdiness M.R., Morgan L.R. jr.: High-performance liquid chromatographic analysis of 5-chloroaminotoluene in rats. *J. Chromatogr.* 1983; 193: 278-280.
- Knowles C.O., Sen Gupta A.K.:  $N^1$ -(4-chloro-o-tolyl)- $N,N$ -dimethylformamidine ( $^{14}C$  galecron) and 4-chloro-o-toluidine- $^{14}C$  metabolism in the white rat. *J. Econ. Entomol.* 1970; 63: 856-859.
- Knowles C.O.: Metabolism of two acaricidal chemicals,  $N^1$ -(4-chloro-o-tolyl)- $N,N$ -dimethylformamidine (chlorphenamidine) and  $m$ -((dimethylamino)methylene) aminophenyl methylcarbamate hydrochloride (formetanate). *J. Agric. Food Chem.* 1970; 18: 1038-1047.
- Hill D.T., Shik W., Struck R.F.: Macromolecular binding and metabolism of the carcinogen 4-chloro-2-methylaniline. *Cancer Res.* 1979; 39: 2528-2531.
- Miller J.A.: Carcinogenesis by chemicals. An overview. *Cancer Res.* 1970; 30: 559-576.
- Miller J.A., Miller E.C.: Some historical aspects of  $N$ -arylcarcinogens and their metabolic activation. *Environ. Health Perspect.* 1983; 49: 3-12.
- Bentley P., Bieri F., Muecke W., Waechter F., Staubli W.: Species differences in the toxicity of  $p$ -chloro- $o$ -toluidine to rats and mice. *Chem. Biol. Interact.* 1985; 57: 27-40.
- Lutz W.K.: Doniesienie osobiste, 1990.
- Lutz W.K.: *In vivo* covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. *Mutat. Res.* 1979; 65: 289-356.
- Lutz W.K.: Quantitative evaluation of DNA binding data for risk estimation and classification of direct and indirect carcinogens. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1986; 112: 85-91.
- Neumann H.G.: Haemoglobin binding in control of exposure to and risk assessment of aromatic amines. W: Bartsch H., Hemminki K., O'Neil I.K. [red.]. *Method for detecting DNA damaging agents in humans*. IARC Scientific Publications, Lyon 1988, ss. 157-165.
- FAO/WHO Evaluations: Pesticide residues in food 1978. FAO, WHO, Rome 1979.
- Zimmer D., Mazurek J., Petzold G., Bhuyan B.K.: Bacterial mutagenicity and mammalian cell DNA damage by several substituted anilines. *Mutat. Res.* 1980; 77: 317-326.
- Rashid K.A., Ercegovich C.D., Mumma R.O.: Evaluation of chlordimeform and degradation products for mutagenic and DNA-damaging activity in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Environ. Sci. Health* 1984; 19: 95-110.
- Seiler J.P.: Inhibition of testicular DNA synthesis by chemical mutagens and carcinogens. Preliminary results in the validation of a novel short term test. *Mutat. Res.* 1977; 46: 305-310.
- Homburger F., Friedell G.H., Weisburger E.K., Weisburger J.H.: Carcinogenicity of simple aromatic amine derivatives in mice and rats [streszczenie]. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1972; 22: 280.
- Weisburger E.K., Russfield A.B., Homburger F., Weissburger J.H., Boger E., Van Dongen C.G. i wsp.: Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 1978; 2: 325-356.
- National Cancer Institute: Bioassay of 4-chloro- $o$ -toluidine hydrochloride for possible carcinogenicity. Technical Report Series No. 165. DHEW Publication, Bethesda 1979.
- Currie A.N.: Chemical haematuria from handling 5-chloro-ortho-toluidine. *J. Ind. Hyg.* 1933; 15: 205-213.
- Lyons J.S.: Hematuria in workmen in aniline dye industry due to 5-chlorotoluidine. *J. Urol. (Balt)* 1947; 58: 277-281.
- Folland D.S., Kimbrough R.D., Cline R.E., Swiggart R.C., Schaffner W.: Acute hemorrhagic cystitis, industrial exposure to the pesticide chlordimeform. *J. Am. Med. Assoc.* 1978; 239: 1052-1055.
- Kimbrough R.D.: Human health effects of selected pesticides, chloraniline derivatives. *J. Environ. Sci. Health* 1980; 15: 977-992.
- Stasik M.J.: Differentialdiagnose der Hämaturie. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1982; 107: 77.

35. Stasik M.J.: 4-chloro-o-toluidine. An etiological agent in the induction of bladder cancer and hemorrhagic cystitis among industrially exposed workers. 23rd International Congress on Occupational Health, 22–28 września 1990, Montreal.
36. Uebelin F., Pletscher A.: Ätiologie und Prophylaxe gewerblicher Tumoren in der Farbstoffindustrie. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1954; 84: 917–920.
37. Ott M.G., Langner R.R.: A mortality survey of men engaged in the manufacture of organic dyes. *J. Occup. Med.* 1983; 25: 763–768.
38. Stasik M.J., Lange H.J., Ulm K., Schuckmann F.: A historic cohort study of 4-chloro-2-methylaniline workers. *MEDICHEM Symposium, Bahia* 1985.
39. Mostofi F.K., Sobin L.H., Torloni H.: Histological typing of urinary bladder tumours. WHO, Geneva 1973.
40. Evans D.A.P.: An improved and simplified method of detecting the acetylator phenotype. *J. Med. Genet.* 1969; 6: 405–407.
41. Lower G.M.: N-acetyltransferase phenotype and risk in industrial urinary bladder cancer. *Approaches to high risk groups.* W: Deichmann W.B. [red.]. *Toxicology and Occupational Medicine.* Elsevier, North Holland – New York – Amsterdam – Oxford 1979.
42. Drayer D.E., Reidenberg M.M.: Clinical consequences of polymorphic acetylation of basic drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1977; 22: 251–258.
43. Stasik M.J.: Harnblasenkrebs durch 4-Chlor-o-toluidin. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1991; 116: 1444–1447.
44. Mitteilung XXIII der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der DFG: Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen. Verlag Chemie, Weinheim 1987.
45. Xue S., Li F., Jang X., Zhou Z., Wang Z.: The risk assessment of occupational exposure to chlordimeform. 23rd International Congress on Occupational Health, Montreal 1990.
46. Breslow N.E., Day N.E.: The standardized mortality ratio. W: Sen P.K. [red.]. *Statistics in Biomedical, Public Health and Environmental Science.* Elsevier, North Holland – New York – Amsterdam – Oxford 1985.
47. Norpoth K., Heger M.: 4-Chlor-o-toluidin als wahrscheinliche Ursache von 5 Erkrankungen nach Ziffer 1301 BeKV. *Verh. Dtsch. Ges. Arbeitssmed.* 1989; 29: 57–59.
48. Popp W., Schmiedlink W., Speck M., Vahrenholz C., Norpoth K.: Incidence of bladder cancer in a cohort of workers exposed to 4-chlor-o-toluidine while synthesizing chlordimeform. *Br. J. Ind. Med.* 1992; 49: 529–531.
49. Norpoth K.: Einführung in die Arbeitsmedizin. Ecomed, Landsberg 1991.
50. Stasik M.J., Konietzko J., Klippel K.F.: Is the 4-chlor-o-toluidine-induced-haemorrhagic cystitis a precancerous state? *J. Cancer Res. Clin. Oncol. Suppl.* 1994; 120: 72.
51. Stasik M.J., Konietzko J., Godlewski A., Fortak W.: Current studies of 4-chloro-o-toluidine and chlordimeform carcinogenicity. 26th International Congress on Occupational Health, 27 sierpnia – 1 września 2000, Singapore.