ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΕ ΦΘΑΛΙΚΟΥΣ ΕΣΤΕΡΕΣ, ΔΙΣΦΑΙΝΟΛΗ-Α, ΠΑΡΑΒΕΝΙΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΚΟΟΡΤΗ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ «ΡΕΑ»

Αντώνης Μυριδάκης[1], Μανόλης Κογεβίνας[2], Λήδα Χατζή[3] και Ευριπίδης Γ. Στεφάνου[1,4]

[1]Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών (Ε.ΠΕ.ΧΗ.ΔΙ.), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάς

[2]Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain

[3]Τομέας Κοινωνικής Ιατρικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάς

[4]Ινστιτούτο Κύπρου, 2121 Αγλαντζιά, Κύπρος

E-mail: I) evris.stephanou@ uoc.gr & II) e.stephanou@cyi.ac.cy

Περίληψη

Οι φθαλικοί εστέρες, τα παραβένια, η δισφαινόλη-α και οι οργανοφωσφορικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλά προϊόντα καθημερινής χρήσης. Η μακροχρόνια έκθεση του ανθρώπου, ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα, έχει συνδεθεί με δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία. Οι επιδράσεις της έκθεσης είναι εντονότερες κατά την εμβρυική ζωή και την πρώιμη παιδική ηλικία. Τα επίπεδα των μεταβολιτών αυτών των χημικών ουσιών στα ούρα χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες έκθεσης στην περιβαλλοντική επιδημιολογία.

Αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν μέθοδοι προσδιορισμού των μεταβολιτών των παραπάνω ενώσεων με χρήση υγρής χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης (RPLC) και υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC), συζευγμένων με διαδοχική φασματομετρία μαζών (MS/MS). Αξίζει να σημειωθεί ότι για πρώτη φορά επετεύχθησαν: ένα κοινό πρωτόκολλο επεξεργασίας ανθρώπινων ούρων για τον προσδιορισμό μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων, παραβενίων και δισφαινόλης-α, όπως και ο διαχωρισμός των ισο- / κ- μορφών των πρόπυλο- και βούτυλο- παραβενίων με χρήση συμβατικής χρωματογραφικής στήλης.

Αναλύθηκαν δείγματα ούρων από 239 εγκυμονούσες γυναίκες, τα ισάριθμα παιδιά τους στην ηλικία των 2.5 ετών και από 500 4-χρονα παιδιά, στα πλαίσια της κοόρτης «ΡΕΑ». Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών ομαδοποίησε την έκθεση σε τρεις κύριες πηγές: I) πλαστικά (φθαλικοί εστέρες, δισφαινόλη-Α), II) καλλυντικά/είδη προσωπικής υγιεινής (δι-αίθυλο-εστέρας του φθαλικού οξέος, παραβένια) και III) τροφή (οργανοφωσφορικές ενώσεις). Βρέθηκαν συσχετίσεις (2-tailed Spearman, $p<0.001$) μεταξύ των επιπέδων συγκεκριμένων μεταβολιτών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και στα παιδιά 2.5 ετών, όπως μεταξύ των επιπέδων των μεταβολιτών, της ηλικίας και του φύλου των παιδιών. Με τη χρήση τοξικοκινητικών μοντέλων, υπολογίστηκε η ημερήσια πρόσληψη αυτών των ενώσεων. Γενικά, βρέθηκε υψηλότερη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και χαμηλότερη στα παιδιά 4 ετών. Παρότι τα επίπεδα έκθεσης στην Ελλάδα είναι συγκρίσιμα με αντίστοιχες, σε άλλες χώρες, μελέτες, δεν θεωρούνται αμελητέα. Για παράδειγμα, το 5% του συνολικού πληθυσμού

υπερέβη το ανώτατο όριο της Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (USEPA) για το δι-αίθυλο-εστέρα του φθαλικού οξέος.

Λέξεις-κλειδιά: HPLC-MS/MS, ενδοκρινικοί διαταράκτες, οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, εκτίμηση έκθεσης, κοόρτη «ΡΕΑ»

Abstract

Phthalate esters, parabens, bisphenol-a and organophosphate compounds are contained in many widely-used daily products. The long-term human exposure to these chemicals, even at low levels, has been linked with adverse health effects. These effects are most intense during embryonic life and early childhood. The metabolite levels of these chemicals are used as exposure biomarkers in environmental epidemiology.

Analytical methods, with the use of reversed phase (RPLC) and hydrophilic interaction (HILIC) liquid chromatography online with tandem mass spectrometry (MS/MS), were developed and applied. It has to be mentioned, that for the first time, are reported: I) a common human urine sample preparation protocol for the determination of phthalate metabolites, bisphenol-a and parabens, and II) the chromatographical separation of iso- and n- forms of propyl- and butyl- parabens, with the use of conventional HPLC columns.

Exposure levels were assessed in a mother-child cohort (Crete, Greece) during pregnancy (6th months of age, 239 samples) and at children (2.5 years old, 239 samples and 4 years old, 500 samples). Principal component analysis grouped the exposure to three main sources: I) plastic (phthalates esters-BPA), II) cosmetics/personal care products (diethyl phthalate-parabens) and food (organophosphate compounds). There were correlations for specific metabolite (2-tailed Spearman, $p<0.001$) between levels a) at pregnancy and at 2.5 year old children b) and children age/gender. Total daily intake was calculated; in general it was highest in mothers and lowest in 4 years old children. Although levels in our country in most of the studied chemicals are comparable with other studies, exposure is significant. In some cases exceeded ESA and USEPA limits (e.g. 5% of all subjects exceeds USEPA-TDI for di-2ethylhexyl phthalate (DEHP)).

Keywords: HPLC-MS/MS, endocrine disruptors, organophosphate pesticides, exposure assessment, "Rhea" cohort

1. Εισαγωγή

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες (Endocrine disruptors, EDs) είναι οργανικές ενώσεις που παρεμβαίνουν στην ομαλή λειτουργία του ορμονικού συστήματος στα θηλαστικά. Οι EDs, αλληλεπιδρούν με φυσικές ορμόνες, όπως την εστραδιόλη, την οιστρόνη και την οιστρόλη, που είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη, τη συμπεριφορά και τη διατήρηση της ομοιόστασης. Η έκθεση στους ενδοκρινικούς διαταράκτες κατά τα διάρκεια του «προγραμματισμού» του ενδοκρινικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη αλλαγή της λειτουργίας του. Αντιθέτως, η έκθεση κατά τη διάρκεια της ενηλικίωσης, μπορεί να αντισταθμιστεί από τους φυσιολογικούς ομοιοστατικούς μηχανισμούς και έτσι μπορεί να μην οδηγήσει τελικά σε αντίστοιχα σημαντικές επιδράσεις Vandenberg et al. (2009). Η δισφαινόλη-Α (bisphenol-A, BPA), τα παραβένια (parabens, PBs) και οι φθαλικοί εστέρες (phthalate esters, PEs) είναι από τους σημαντικότερους EDs. Η παγκόσμια ετήσια παραγωγή της BPA ανέρχεται σε 3 εκατομμύρια τόνους, των PEs πάνω από 8 εκατομμύρια τόνους και είναι από τις μεγαλύτερης παραγωγής χημικές ουσίες ενώ τα PBs χρησιμοποιούνται σε πάνω από 13.200 παρασκευές για σχεδόν κάθε καλλυντικό (Crinnion 2010, Flint et al. 2012, Juhasz et al. 2014). Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις (organophosphate chemicals, OPs) αποτελούν τη βάση για τη μεγαλύτερη κατηγορία φυτοφαρμάκων. Παρουσιάζουν νευροτοξική δράση αναστέλλοντας την ακετυλοχοληνεστεράση Jurewicz et al. (2008). Ο άνθρωπος εκτίθεται στις παραπάνω χημικές ουσίες μέσω του περιβάλλοντος, της πρόσληψης τροφής και της κατανάλωσης προϊόντων επιβαρυμένων με αυτές διαμέσου της αναπνοής, της δερματικής επαφής, της κατάποσης και του πλακούντα από τον εγκυμονούσα γυναίκα στο έμβρυο (Kamanyire et al. 2004, Meeker at al. 2010).

Προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα της ανθρώπινης έκθεσης στις παραπάνω κατηγορίες χημικών, απαιτείται ο προσδιορισμός των μεταβολιτών (ελευθέρων και συζευγμένων μορφών) των παραπάνω ενδοκρινικών διαταρακτών και νευροτοξικών χημικών (Barr et al. 2008, Silva et al 2003, Thayer et al. 2015, Ye el al. 2006). Οι χρόνοι ημιζωής (elimination half times, EHT) αυτών των ενώσεων μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό είναι ιδιαίτερα χαμηλοί. Παραδείγματος χάρη, η BPA, ο δι-αίθυλ-έξυλο φθαλικός εστέρας (di-2-ethyl-hexyl phthalate, DEHP) και τα OPs αποβάλλονται στη μορφή των μεταβολιτών τους λίγες ώρες μετά την είσοδο τους στον οργανισμό (Egeghy et al. 2011, Koch et al. 2005). Επίσης, οι επιδράσεις της έκθεσης είναι κατά πολύ εντονότερες κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ζωής και πρώιμης παιδικής ηλικίας (Neri et al. 2006, Weiss et al 2004). Κατά συνέπεια, υπάρχει η ανάγκη για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις αυτών των επιπέδων σε πληθυσμούς εγκύων και παιδιών μικρής ηλικίας ώστε να εκτιμηθεί η έκθεση τους και να συσχετιστεί με πιθανές επιδράσεις στην υγεία.

1.5. Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού ενδοκρινικών διαταρακτών σε ανθρώπινα ούρα

Οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία, για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών των PEs, της BPA και των PBs , χρησιμοποιούν κυρίως υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας (High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS) με πηγή ιονισμού είτε ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI), είτε χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) (Dewalque et al. 2014, Nicolucci et al. 2013, Ye at al. 2006) αν και δεν υπάρχει καμία αναφορά για ταυτόχρονη ανάλυση των παραπάνω ενώσεων. Επίσης, ο διαχωρισμός των ισομερών κ- και ίσο- των βούτυλο-παραβενίου (butyl

paraben, BPB) και PPB έχει επιτευχθεί μόνο με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υπερύψηλης απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC).

Η πολικότητα των προς μελέτη ενώσεων, η υδατική σύσταση των ούρων όπως και η περιπλοκότητα τους σαν μήτρα και τέλος η ανάγκη για πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης και αναλύσεις μεγάλων αριθμών δειγμάτων για να καλυφθούν οι ανάγκες των επιδημιολογικών μελετών πρακτικά καθιστούν μονόδρομο την επιλογή HPLC-MS/MS σαν αναλυτική μεθοδολογία. Συνοπτικά, οι περισσότερες αναλυτικές μεθοδολογίες αποτελούνται από τα ακόλουθα δύο στάδια επεξεργασίας:

Α) Ενζυμική υδρόλυση των συζευγμένων μεταβολιτών είτε με τη χρήση του ενζύμου E.coli β-glucuronidase για την μέτρηση των ελεύθερων και γλουκουρονιδιομένων μεταβολιτών είτε του ενζύμου H.Pomatia β-glucuronidase, για την μέτρηση των ελεύθερων, των γλουκουρονιδιομένων και των σουλφονιομένων μεταβολιτών των ενώσεων

Β) Καθαρισμός των δειγμάτων ούρων με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

1.6. Μελέτη «ΡΕΑ»

Η υπόθεση ότι τα εμβρυϊκά και πρώιμα γεγονότα της ζωής οδηγούν σε μόνιμες μεταβολικές ή αναπτυξιακές αλλαγές από την δεκαετία του ’80 ακόμα, μετά από μια σειρά σημαντικών επιδημιολογικών παρατηρήσεων που συνέδεσαν την μείωση του βάρους γέννησης με έναν αυξημένο κίνδυνο ασθενειών της ενήλικης ζωής, συμπεριλαμβανομένου του σακχαρώδους διαβήτη τύπου-2, του μεταβολικού συνδρόμου, της υπέρτασης, και των καρδιαγγειακών παθήσεων (World Health Organization 2012). Για την προώθηση της γνώσης στον τομέα αυτό απαιτούνται μετρήσεις οι οποίες να είναι ακριβείς και να μπορούν να αναδείξουν τις αιτιολογικές σχέσεις μεταξύ έκθεσης και ασθένειας, αλλά και να επιτρέπουν την διατύπωση συστάσεων και την διαμόρφωση πολιτικών δημόσιας υγείας που να βελτιώνουν το περιβάλλον ανάπτυξης των παιδιών και να μειώνουν το κοινωνικοοικονομικό κόστος σοβαρών χρόνιων ασθενειών. Ο καταλληλότερος σχεδιασμός τέτοιων μελετών είναι η προοπτική επιδημιολογική μελέτη μητέρας-παιδιού (mother-child cohort), στα πλαίσια της οποίας τόσο οι περιβαλλοντικές εκθέσεις όσο και η κατάσταση υγείας των παιδιών παρακολουθούνται από την φάση της κύησης μέχρι και την ενηλικίωση και αναζητούνται συσχετισμοί μεταξύ τους. Στην Ευρώπη έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές προοπτικές μελέτες μητέρας-παιδιού κατά τις τελευταίες δεκαετίες.

Η μελέτη Μητέρας-Παιδιού Κρήτης (Μελέτη ΡΕΑ), είναι η πρώτη και μοναδική μελέτη μητέρας-παιδιού που πραγματοποιείται στην Ελλάδα και περιλαμβάνει ένα δείγμα περίπου 1.500 εγκύων γυναικών και των παιδιών τους που έχουν ως μόνιμη κατοικία το νομό Ηρακλείου (Chatzi et al. 2009).

1.7. Στόχος της μελέτης

Ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της έκθεσης σε PEs, PBs, BPA και OPs κατά την εμβρυική και πρώιμη παιδική ηλικία για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Αρχικά, η μελέτη εστιάστηκε στην ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού των μεταβολιτών των προαναφερθέντων ενδοκρινικών διαταρακτών σε ανθρώπινα ούρα με χρήση HPLC-MS/MS. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ήταν τα εξής:

I) ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των μεταβολιτών των PEs, PBs και BPA

II) ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ισο- και κ- ισομερών των propyl paraben (PPB) και butyl paraben (BPB) με χρήση συμβατικών χρωματογραφικών στηλών και αντλιών (χωρίς τη χρήση UPLC)
III) την επίτευξη των ελαχίστων δυνατών ορίων
IV) και τέλος την ικανότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στην ανάλυση δειγμάτων ούρων προερχόμενων από συμμετέχοντες στη μελέτη «ΡΕΑ» και πιο συγκεκριμένα από διακόσιες τριάντα εννέα (239) εγκυμονούσες γυναίκες, τα παιδιά τους στην ηλικία των 2.5 ετών και από πεντακόσια (500) παιδιά 4 ετών. Ο προσδιορισμός των μεταβολιτών των OPs βασίστηκε σε ήδη υπάρχουσα μελέτη Odetokun et al. (2010). Οι επιμέρους στόχοι για την εκτίμηση της έκθεσης ήταν οι παρακάτω:

V) ο προσδιορισμός για πρώτη φορά στην Ελλάδα των επιπέδων μεταβολιτών των PEs, των PBs, της BPA και των OPs
VI) η διερεύνηση της σχέσης της έκθεσης πριν (εγκυμοσύνη) και μετά τη γέννηση (2.5 και 4 έτη),
VII) η εκτίμηση της ημερήσιας πρόσληψης σε PEs, PBs, BPA και OPs
VIII) η εκτίμηση των πηγών έκθεσης
IX) η σύγκριση των επιπέδων έκθεσης στην Ελλάδα με άλλες αντίστοιχες μελέτες μέσω συστηματικής βιβλιογραφικής αναζήτησης

2. Αποτελέσματα και συζήτηση

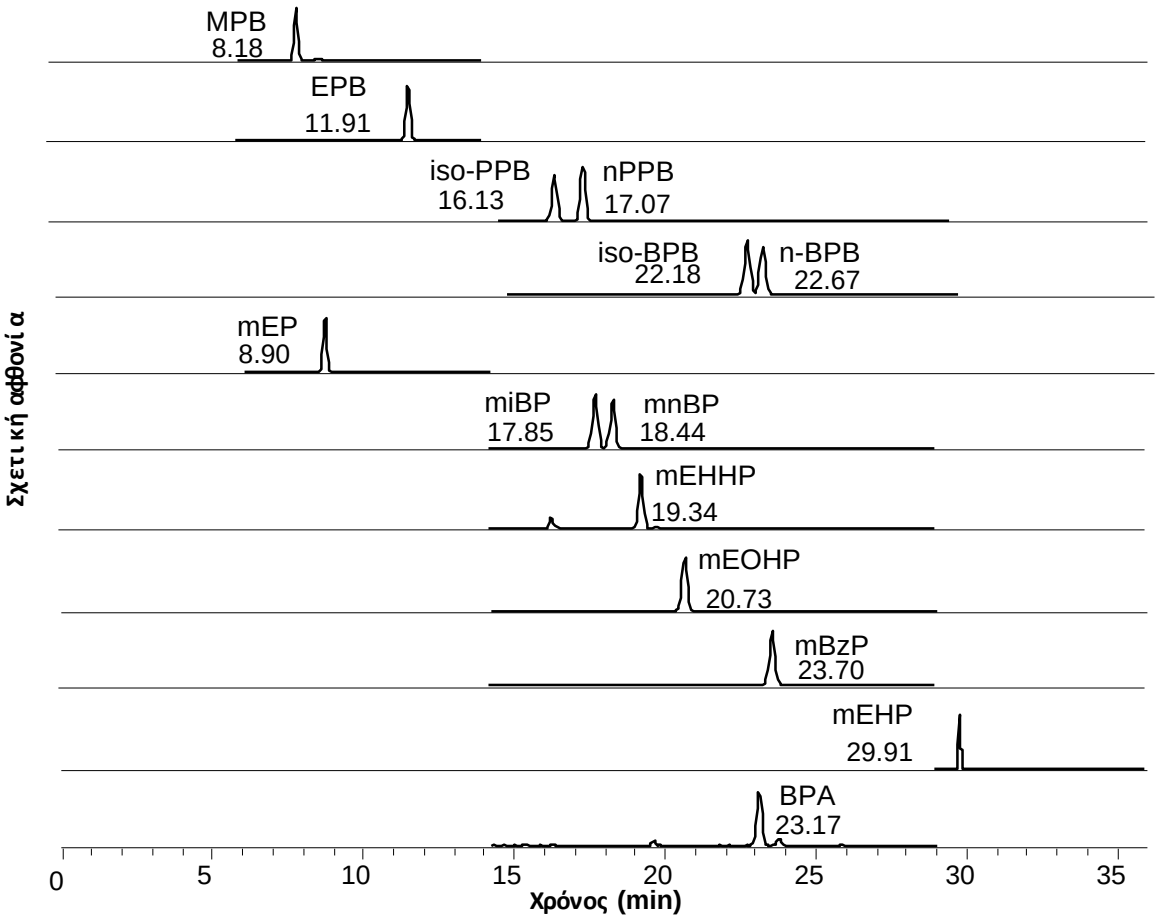
2.1. Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό μεταβολιτών των PEs, PBs και BPA

Αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος προσδιορισμού των επιπέδων επτά μεταβολιτών των PEs, έξι PBs και της BPA σε ανθρώπινα ούρα με χρήση HPLC-MS/MS Myridakis et al. (2015a).

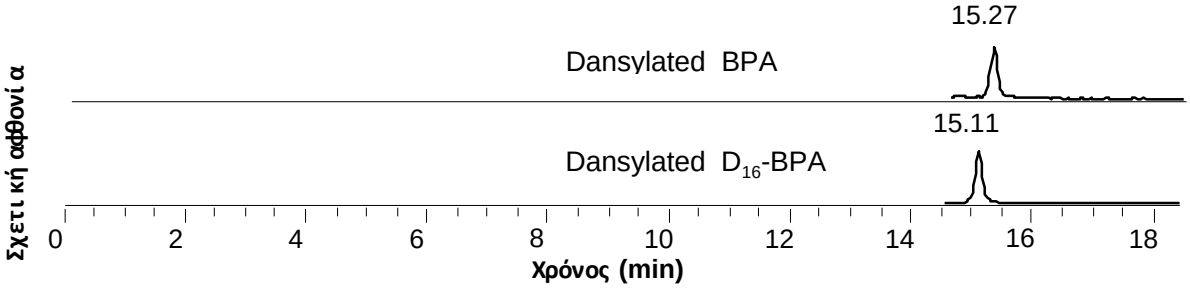
Οι τρεις αυτές κατηγορίες ενδοκρινικών διαταρακτών απομονώθηκαν με εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) για πρώτη φορά ταυτόχρονα από τα δείγματα ούρων. Επιπλέον για πρώτη φορά αναφέρεται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ισο- και κ- ισομερών των PPB και BPB χωρίς τη χρήση χρωματογραφίας UPLC (με συμβατικές στήλες ανάστροφης φάσης). Η ανάλυση στο HPLC-MS/MS βελτιστοποιήθηκε με δύο πηγές ιονισμού, ηλεκτροψεκασμό (Electrospray, ESI) και χημικό ιονισμό υπό ατμοσφαιρική πίεση (atmospheric pressure chemical ionisation, APCI). Επιλέχθηκε ο ESI για την καλύτερη σταθερότητα και επαναληψιμότητα που επέδειξε. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (method limits of detection, mLOD) την ταυτόχρονη χρωματογραφική ανάλυση και των τριών κατηγοριών ενώσεων κυμάνθηκαν μεταξύ 0.01 και 0.84 ng/mL ούρων για τους μεταβολίτες των PEs, μεταξύ 0.06 και 0.24 ng/mL για τα PBs και 2.01 ng/mL για την BPA. Στην Εικόνα 1 παρατίθεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα πραγματικού δείγματος.

Τα πολύ χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων της BPA, ιδιαίτερα στα ούρα παιδιών μικρής ηλικίας οδήγησε στην ανάγκη για ακόμα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης. Η παραγοντοποίηση της BPA με dansyl chloride μείωσε το mLOD της στα 0.007 ng/mL. Η αντίδραση παραγοντοποίησης ήταν απλή, σύντομη και πραγματοποιούνταν μέσα στο φιαλίδιο (vial) της

HPLC μετά την ανάλυση για μεταβολίτες PEs και PBs. Ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα πραγματικού δείγματος παρατίθεται στην Εικόνα 2. Τυχούσες επιμολύνσεις κατά την επεξεργασία των δειγμάτων δεν ήταν ανιχνεύσιμες. Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς σε δείγματα προερχόμενα από ένα ανδρικό πληθυσμό ογδόντα (80) ατόμων από την περιοχή της πόλης του Ηρακλείου.



Εικόνα 1. Χρωματογράφημα δείγματος ούρων όπου παρακολουθούνται ταυτόχρονα οι μεταβολίτες των PEs, τα PBs και η BPA



Εικόνα 2. Χρωματογράφημα δείγματος ούρων όπου παρακολουθείται η dansylated-BPA και το δευτεριωμένο ανάλογο της

2.2. Επίπεδα έκθεσης PEs, PBs και BPA σε ζευγάρια μητέρας-παιδιού της μελέτης «PEA»

Παρουσιάζονται τα επίπεδα συγκεντρώσεων επτά μεταβολιτών των PEs, έξι PBs και της BPA σε δείγματα από διακόσια τριάντα εννέα ζευγάρια μητέρας ($4^{ος}$ μήνας εγκυμοσύνης) - παιδιού (2.5 έτη), προερχόμενα από τη μελέτη «PEA» Myridakis et al. (2015b). Τα επίπεδα συγκεντρώσεων και στους δυο πληθυσμούς ήταν σε συγκρίσιμα επίπεδα με αντίστοιχες εργασίες από άλλες χώρες. Σε τρεις PEs (di-ethyl phthalate, DEP/ di-n-butyl phthalate, DnBP/ butyl-benzyl phthalate BBP) και στο lEPB βρέθηκαν ασθενείς αλλά στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (CC 0.1-0.2, $p<0.01$) μεταξύ των επιπέδων στις μητέρες κατά την εγκυμοσύνη και στα παιδιά περίπου τρία χρόνια αργότερα (Πίνακας 1). Συνυπολογίζοντας το χρόνο ημιζωής αυτών των ενώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό, με διάρκεια λίγων ημερών διαφαίνεται η ύπαρξη κοινών και σταθερών πηγών εκπομπής στη διάρκεια του χρόνου. Επίσης η ηλικία των παιδιών συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα συγκεντρώσεων όλων των μελετώμενων ενώσεων.

Πίνακας 1. Συντελεστές συσχέτισης (2-tailed Spearman, $p< 0.01$) μεταξύ των επιπέδων συγκεντρώσεων στις εγκυμονούσες γυναίκες, τα παιδιά και την ηλικία των παιδιών.

	C-DEP	C-DiBP	C-DnBP	C-BBzP	C-DEHP	C-MPB	C-EPB	C-nPPB	C-BPA
M-DEP	0.20								
M-DiBP									
M-DnBP			0.23						
M-BBzP				0.18					
M-MPB									
M-EPB							0.13		
M-BPA									
C-Ηλικία (y)	-0.43	-0.43	-0.48	-0.37	-0.19	-0.38	-0.47	-0.38	-0.21

M-: εγκυμονούσες γυναίκες, C-: παιδιά

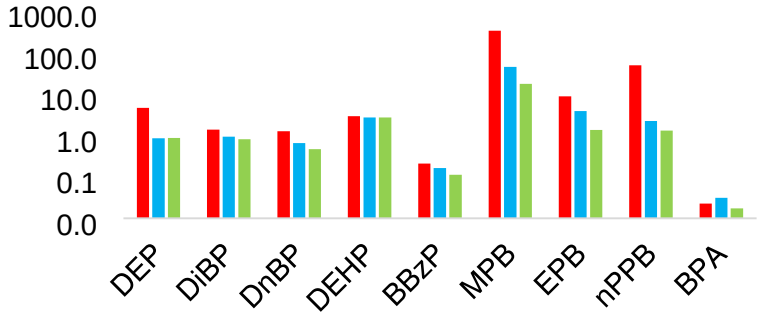
Υπολογίστηκε η ημερήσια πρόσληψη ανά kg σωματικού βάρους και συγκρίνοντας τις διάμεσες τιμές, τα παιδιά βρέθηκαν να έχουν είχαν χαμηλότερα επίπεδα πρόσληψης σε σχέση με τις εγκυμονούσες ημέρες σε όλες τις μελετώμενες ενώσεις εκτός από το di-2ethylhexyl phthalate (DEHP) και την BPA.

Τέλος, μελετήθηκε ο μεταβολισμός του DEHP, υπολογίζοντας τους σχετικούς μεταβολικούς ρυθμούς (ταχύτητα μετατροπής των μεταβολιτών σε δευτερεύοντες μεταβολίτες) και βρέθηκαν διαφοροποιήσεις στις ταχύτητες μετατροπής ανάμεσα στις εγκυμονούσες και τα παιδιά όπως και ανάμεσα στα αρσενικά και θηλυκά παιδιά.

2.3. Επίπεδα έκθεσης PEs, PBs, BPA και OPs σε παιδιά προσχολικής ηλικίας της μελέτης «PEA»

Μετρήθηκαν τα επίπεδα των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών των PEs, BPA, PBs και OPs σε ένα πληθυσμό πεντακοσίων (500) παιδιών προσχολικής ηλικίας (4 ετών), που συμμετέχουν στη μελέτη «PEA» Myridakis et al. (2016). Τα επίπεδα συγκεντρώσεων και στα 4 έτη είναι συγκρίσιμα με αντίστοιχες μελέτες εκτός από τα PBs, τα οποία αν και μειωμένα σε

σχέση με τα παιδιά 2.5 ετών βρίσκονται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με μια αντίστοιχη εργασία που έγινε στη Δανία. Όσον αφορά στα OPs, γενικά τα συνολικά επίπεδα τους είναι συγκρίσιμα με άλλες χώρες αλλά με επιμέρους διαφορές ανά μεταβολίτη, γεγονός που υποδεικνύει χρήση διαφορετικών φυτοφαρμάκων. Με βάση τους μεταβολίτες των OPs που βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα και τα καταγεγραμμένα φυτοφάρμακα στο Υπουργείο Γεωργίας Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, έγινε αντιστοίχιση των μεταβολιτών με τα πιθανά πρόδρομα φυτοφάρμακα. Το πιο ανησυχητικό εύρημα ήταν τα υψηλά επίπεδα του di-ethyl-thio phosphate (DETP), το οποίο μπορεί να προέλθει από πολύ τοξικά απαγορευμένα OPs, όπως το Diazinon και το Parathion. Η υπολογισμένη ημερήσια πρόσληψη ενδοκρινικών διαταρακτών ανά kg σωματικού βάρους ήταν χαμηλότερη στα παιδιά προσχολικής ηλικίας συγκριτικά με τα παιδιά 2.5 ετών και τις εγκυμονούσες γυναίκες (Εικόνα 3). Σε ορισμένες περιπτώσεις ωστόσο, υπερέβη τα θεσπισμένα ανώτατα όρια της Αμερικάνικης Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος (U.S. Environmental Protection Agency Tolerable Daily Intake) όπως και της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Authority Reference Doses). Υπολογίστηκαν επίσης, με βάση περιβαλλοντικές (αέρας εσωτερικού χώρου και πόσιμο νερό) μετρήσεις επιπέδων PEs στην περιοχή του Ηρακλείου, η ημερίσια πρόσληψη μέσω της αναπνοής και της κατανάλωσης πόσιμου νερού. Η συνεισφορά και των δυο αυτών μονοπατιών έκθεσης είναι χαμηλή σε σχέση με την ολική ημερίσια πρόσληψη που υπολογίστηκε με βάση τις συγκετρώσεις στα ούρα.

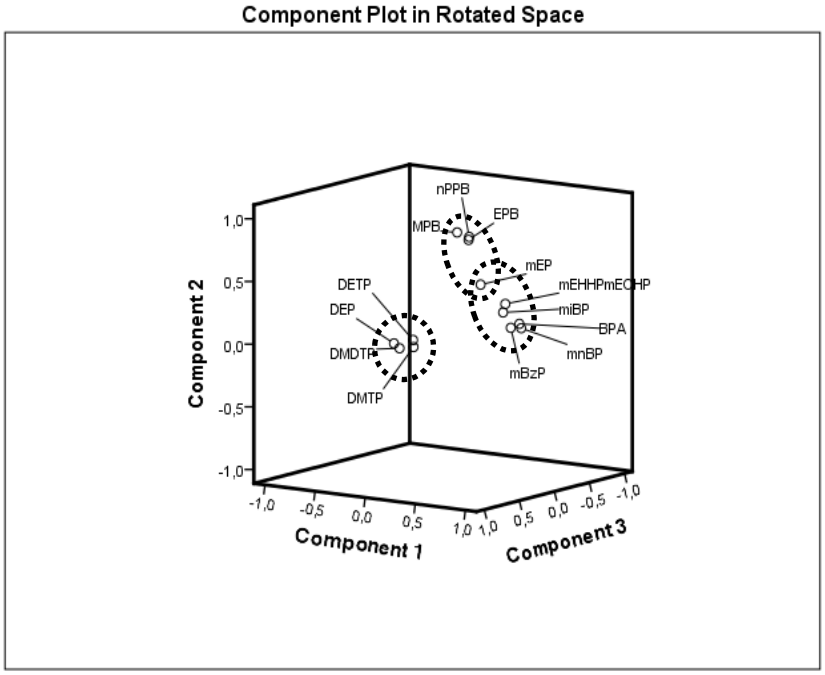


Εικόνα 3. Σύγκριση επιπέδων ημερήσιας πρόσληψης (διάμεσες τιμές, μg x kg^{-1} x d^{-1}). Εγκυμονούσες γυναίκες, παιδιά 2.5 ετών, παιδιά 4 ετών.

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal component analysis, PCA) ομαδοποίησε την έκθεση σε τρεις κύριες κατηγορίες (Εικόνα 4). Οι πηγές έκθεσης ομαδοποιήθηκαν με αντίστοιχο τρόπο (A: πλαστικό, B: είδη προσωπικής υγιεινής και φροντίδας) με τα παιδιά 2.5 ετών και τις εγκυμονούσες γυναίκες. Η έκθεση φαίνεται να γίνεται σε μίγματα των ενώσεων και πιο συγκεκριμένα σε μίγματα PEs και BPA (mEP/mEHHP/MEOHP/miBP/mnBP/mBzP/BPA), όπου χρησιμοποιούνται κατά κόρον στο πλαστικό και σε μίγματα PBs και DEP (mEP/EPB/MPB/nPPB), που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στα προϊόντα προσωπικής φροντίδας-υγιεινής. Στα παιδιά προσχολική ηλικίας όπου ήταν διαθέσιμα και δεδομένα για OPs, παρατηρήθηκε άλλη μια αυτόνομη πηγή έκθεσης που ομαδοποιεί αυτόνομα τους μεταβολίτες των OPs (DETP/DEP/DMTP/DMDTP) και υποδεικνύει ως πηγή την τροφή.

Μελετήθηκε η σχετική ταχύτητα μετατροπής του DEHP στους μεταβολίτες του και ένα από τα στάδια του μεταβολισμού του DEHP (μετατροπή του mEHP σε mEHHP), και βρέθηκε να γίνεται πιο γρήγορα στα παιδιά 4 ετών ($p<0.01$).

Τέλος, αναλύοντας τα κλινικά δεδομένα των μελών της μελέτης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η θετική συσχέτιση της αυξημένης παχυσαρκίας στα παιδιά και των επιπέδων της BPA Vafeidi et al. (2016).



Εικόνα 4. Ανάλυση κυρίων συνιστωσών: κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών σε τρεις κύριες πηγές έκθεσης

3. Βιβλιογραφία

Barr D. B. and Needham L. L., “Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review”, J. Chromatogr. B, 778 (1-2), 5-29, 2002.

Chatzi L. et al., “The metabolic syndrome in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus.”, Diabetes Metab., 35 (6), 490-494, 2009.

Crinnion W. J., “Toxic effects of the easily avoidable phthalates and parabens. Altern. Med. Rev., 15, (3), 190-196, 2010.

Dewalque L., Pirard C., Dubois N. and Charlier C. Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry., J. Chromatogr. B, 949-950, 37-47, 2014.

Egeghy P.P. et al., “Review of pesticide urinary biomarker measurements from selected US EPA children's observational exposure studies.”, Int J Environ Res Public Health, 8(5):1727-54, 2011.

Flint S., Markle T., Thompson S. and Wallace E., Bisphenol a exposure, effects, and policy: A wildlife perspective., J.Environ. Manag. .104:19-34, 2012.

Juhasz, M. L. and Marmur, E. S., A review of selected chemical additives in cosmetic products., Dermatol. Ther., 27, (6), 317-322, 2014.

Jurewicz J. and Hanke W., Prenatal and childhood exposure to pesticides and neurobehavioral development: review of epidemiological studies., Int. J. Occup. Med. Environ. Health, 21 (2), 121-132.14, 2008.
Kamanyire R. and Karalliedde L., Organophosphate toxicity and occupational exposure., Occup. Med. 54 (2), 69-75, 2004.
Koch, H. M.; Bolt, H. M.; Preuss, R. and Angerer, J., New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP., Arch. Toxicol., 79 (7), 367-376, 2005.
Meeker J. D., Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health., Maturitas, 66 (3), 236-241, 2010.
Myridakis A., Balaska E., Gkaitatzi C., Kouvarakis A. and Stephanou E. G., Determination and separation of bisphenol A, phthalate metabolites and structural isomers of parabens in human urine with conventional high-pressure liquid chromatography combined with electrospray ionisation tandem mass spectrometry., Anal. Bioanal. Chem., 407 (9), 2509-2518, 2015.
Myridakis A., Fthenou E., Balaska E., Kogevinas M. and Stephanou, E.G., Phthalate esters and parabens exposure among mothers and their children in Greece (RHEA cohort)., Env. Int., (83), 1-10, 2015
Myridakis A., Chalkiadaki G, Fotou M., Kogevinas M., Chatzi L. and Stephanou, E.G., Exposure of preschool-age Greek children (RHEA cohort) to bisphenol-A, parabens, phthalates and organophosphates,. Environ Sci. Technol., 50 (2), 932-941, 2016.
Neri M. et al., Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage I. Overview and critical issues., Mutat. Res-Rev. Mutat., 612 (1), 1-13, 2006.
Nicolucci C. et al., A high selective and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantization of bpa urinary levels in children,. Anal. Bioanal. Chem., 405:9139-9148, 2013.
Odetokun et al., Quantification of dialkylphosphate metabolites of organophosphorus insecticides in human urine using 96-well plate sample preparation and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry., J. Chromatogr. B, 878 (27), 2567-2574, 2010.
Silva M. J. et al., Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites., Arch. Toxicol., 77 (10), 561-567, 2003.
Thayer K.A. et al., Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration., Environ. Int., 83, 107-115, 2015.
Vandenberg L.N., Hauser R., Marcus M., Olea N. and Welshons W.V., Human exposure to bisphenol a (bpa)., Reprod. Toxicol., 24:139-177, 2007.
Vafeiadi M. et al., Association of early life exposure to bisphenol A with obesity and cardiometabolic traits in childhood., Env. Res., 146, 379-387, 2016.
Weiss B., Amler S. and Amler R.W., Pesticides., Pediatrics, 113 (4), 1030-1036, 2004.
World Health Organization. 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals. http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/, 2012.
Ye X.Y., Bishop A.M., Reidy J.A., Needham L.L. and Calafat A.M., Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans., Environ. Health Perspect., 114 (12), 1843-1846, 2006.