

ΜΑΡΙΑ ΜΑΡΓΑΡΙΤΗ

**ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΕ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ
ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΩΝ
ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ
ΤΡΙΧΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΚΑΙ ΕΠΕΚΤΑΣΗ
ΑΥΤΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

ΜΑΡΙΑ ΜΑΡΓΑΡΙΤΗ

**ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΕ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ
ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΩΝ
ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ
ΤΡΙΧΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΚΑΙ ΕΠΕΚΤΑΣΗ
ΑΥΤΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΝΙΚΟΣ ΧΑΝΙΩΤΑΚΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΜΕΛΟΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΓΙΩΡΓΟΣ ΤΖΑΝΑΚΑΚΗΣ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΛΟΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΚΟΓΕΒΙΝΑΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΝΔΡΕΑΣ ΤΣΑΚΑΛΩΦ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ

Για την προστασία των πνευματικών δικαιωμάτων το περιεχόμενο των πειραματικών δεδομένων της διδακτορικής διατριβής επιτρέπεται να αναδημοσιευτεί μόνο με τη γραπτή άδεια του επιβλέποντα καθηγητή.

Αφιερώνεται στους γονείς μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία που ακολουθεί εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Τοξικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Τοξικολογίας κ. Αριστείδη Τσατσάκη για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας και τις υποδείξεις του κατά τη συγγραφή της.

Επίσης ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής για την εξέταση της εργασίας μου και τις παρατηρήσεις τους.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Χημείας κ. Ανδρέα Τσακάλωφ για την ποικιλόμορφη βοήθεια, την ουσιαστική συμπαράσταση και τις εποικοδομητικές του παρατηρήσεις και διορθώσεις στο περιεχόμενο αυτών των σελίδων. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή της Αναλυτικής Χημείας κ. Νίκο Χανιωτάκη για την υποστήριξη σε αυτή την προσπάθεια και τις εύστοχες υποδείξεις του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω και προς όλους τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Τοξικολογίας για τις εποικοδομητικές τους παρατηρήσεις. Εκφράζονται ευχαριστίες στον Δρα Θανάση Αλεγκάκη για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και για τη μελέτη του κειμένου και τις χρήσιμες παρατηρήσεις του. Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται και προς τον ζωκόμο κ. Μανώλη Παπαδογιωργάκη για τη φροντίδα και μεταχείριση των πειραματοζώων καθώς και στο συνάδελφο κ. Μανώλη Τζατζαράκη που βοήθησε να συλλεχθούν τα δείγματα τριχών από τα πειραματόζωα.

Θερμά ευχαριστώ το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, που μου έδωσε τη δυνατότητα και την ευκαιρία να υλοποιήσω την παρούσα εργασία.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου και τα αγαπημένα μου πρόσωπα για την ουσιαστική συμπαράσταση που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια, καθώς χωρίς αυτή η υλοποίηση της παρούσας εργασίας δεν θα ήταν δυνατή.

Περίληψη

Μια αναλυτική μέθοδος αναπτύχθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό τριών dialkyl phosphate (DAP) μεταβολιτών, του dimethyl phosphate (DMP), του dimethyl thiophosphate (DMTP) και του diethyl phosphate (DEP), οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων σε δείγματα τριχών. Η προτεινόμενη μεθοδολογία περιλαμβάνει ξέπλυμα της τρίχας, στερεή-υγρή εκχύλιση και ακολουθεί υγρή-υγρή εκχύλιση, παραγωγοποίηση με pentafluorobenzyl bromide, καθαρισμός σε στήλη Florisil/PSA και ανάλυση με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Για την εξαγωγή των μεταβολιτών από την τρίχα χρησιμοποιήθηκε νερό.

Σε δίχρωμα κουνέλια χορηγήθηκε το dimethoate (0, 12 ή 24 mg kg⁻¹ σ.β. ημερησίως) από το στόμα με το νερό και μετρήθηκαν τα επίπεδα των δυο μεταβολιτών του (DMP, DMTP) σε δείγματα τριχών που συλλέχτησαν από τα πειραματόζωα 4 και 6 μήνες μετά την έναρξη της χορήγησης. Μελετήθηκε η επίδραση της δόσης και η επίδραση της διάρκειας χορήγησης αυτού του οργανοφωσφορικού φαρμάκου καθώς και του χρώματος της τρίχας στις τιμές συγκέντρωσης των DAP μεταβολιτών του στις τρίχες. Για να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, 30 δείγματα τριχών από αγρότες αναλύθηκαν.

Η μέθοδος παρουσιάζει καλή γραμμικότητα σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Ικανοποιητικές τιμές ανακτήσεων προέκυψαν από την εφαρμογή της, που κυμαίνονταν μεταξύ 58.8-101.4% για τις τρίχες πειραματοζώων και 56.1-107.9% για τις ανθρώπινες τρίχες, ενώ τα όρια ανίχνευσης κυμαίνονταν μεταξύ 0.01-0.08 ng mg⁻¹ και 0.02-0.10 ng mg⁻¹ για τις τρίχες πειραματοζώων και ανθρώπων, αντίστοιχα.

Η μελέτη ανέδειξε ότι φαίνεται να υπάρχει μια σημαντική σχέση μεταξύ του επιπέδου της δόσης του dimethoate και των τιμών συγκέντρωσης των δύο DAP μεταβολιτών του στις τρίχες. Από την άλλη μεριά, ανάμεικτα αποτελέσματα για τη σημαντικότητα της σχέσης μεταξύ της διάρκειας χορήγησης και των επιπέδων των δυο DAPs στην τρίχα παρατηρούνται. Το χρώμα της τρίχας δεν φαίνεται να επηρεάζει τις τιμές συγκέντρωσης του DMTP, ενώ φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην εναπόθεση του DMP. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων τριχών των αγροτών δείχνουν ότι η προτεινόμενη μέθοδος είναι

κατάλληλη για την παρακολούθηση της επαγγελματικής έκθεσης του ανθρώπου σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα. Ο DEP είναι ο μεταβολίτης που ανιχνεύτηκε πιο συχνά στα δείγματα τριχών των αγροτών και ακολουθεί ο DMP.

Τα αποτελέσματά μας συνηγορούν ότι η ανάλυση των DAPs στην τρίχα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της χρόνιας έκθεσης στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα.

Λέξεις-κλειδιά: Τρίχες, οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, dialkyl phosphates, dimethoate, αέρια χρωματογραφία, φασματομετρία μάζας

Abstract

An analytical approach for the quantitative determination of three dialkyl phosphate (DAP) metabolites, dimethyl phosphate (DMP), dimethyl thiophosphate (DMTP) and diethyl phosphate (DEP), of organophosphate pesticides (OPs) in hair samples has been developed. The proposed methodology comprises a decontamination step, solid-liquid extraction, followed by liquid-liquid extraction, pentafluorobenzyl bromide derivatization, clean-up on Florisil/PSA column and analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The analytes were extracted from hair with water.

Two-coloured rabbits were daily exposed to dimethoate (0, 12 or 24 mg kg⁻¹ body weight) via their drinking water and their hair samples, obtained 4 and 6 months after the beginning of exposure, were analyzed for the presence of its two metabolites (DMP, DMTP). The influence of dose and dose duration of this OP, as well as the effect of hair colour on the concentrations of its DAPs in hair were investigated. To test the efficiency of the method, a 30 samples of hair from agricultural workers were analyzed.

The procedure was shown to be linear over a wide range of concentration. Satisfactory recoveries were obtained ranging from 58.8 to 101.4% for rabbit hair and from 56.1 to 107.9% for human hair, whereas the limits of detection ranged from 0.01 to 0.08 ng mg⁻¹ and from 0.02 to 0.10 ng mg⁻¹ for rabbit and human hair, respectively.

The present work shows that there appears to be a significant relationship between the dose of dimethoate and the concentration values of its two DAP metabolites in hair. On the other hand, mixed results for the significance of the relationship between dose duration and the levels of the two DAPs in hair are observed. Hair pigmentation does not appear to affect the concentration values of DMTP, whereas it seems to be a critical factor in the incorporation of DMP into hair. The results obtained from the analysis of hair samples of agricultural workers show the suitability of the proposed method for monitoring people occupationally exposed to OPs. DEP was the most frequently detected metabolite in hair samples from agricultural workers, followed by DMP.

These data confirm the ability of hair testing to assess chronic OP exposure by the detection of DAPs.

Keywords: Hair, organophosphate pesticides, dialkyl phosphates, dimethoate, gas chromatography, mass spectrometry

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελ.
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Οξείες και χρόνιες δηλητηριάσεις από φυτοφάρμακα	9
1.2. Αξιολόγηση κινδύνου για τον άνθρωπο	11
1.3. Παρασιτοκτόνα	12
1.3.1. Οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	13
1.3.1.1. Δηλητηρίαση με οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	17
1.3.1.2. Μεταβολισμός οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων	18
1.4. Μέθοδοι προσδιορισμού της έκθεσης σε φυτοφάρμακα.....	20
1.4.1. Μέθοδοι προσδιορισμού της έκθεσης σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	23
1.4.1.1. Η διαμόρφωση της τρίχας	29
1.5. Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	30
1.5.1. Η μελέτη σε πειραματόζωα.....	30
1.5.2. Η μελέτη σε ανθρώπους.....	32
1.6. Στοιχεία για το χορηγούμενο σε πειραματόζωα Dimethoate	33
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	37
2.1. Αντιδραστήρια και υλικά	37
2.2. Ερευνητικό πρωτόκολλο μελέτης σε πειραματόζωα	38
2.3. Συλλογή δειγμάτων από ανθρώπους	39
2.4. Αναλυτικά όργανα.....	39
2.4.1. Αέρια χρωματογραφία.....	39
2.4.2. Φασματομετρία μάζας	40
2.5. Προετοιμασία του δείγματος	41
2.6. Δείγματα ποιοτικού ελέγχου.....	42
2.6.1. Μελέτη σε πειραματόζωα	42
2.6.2. Μελέτη σε ανθρώπους.....	42
2.7. Ποσοτικός προσδιορισμός	43
2.8. Έλεγχος της αξιοπιστίας της μεθόδου.....	43

2.8.1. Μελέτη σε πειραματόζωα	43
2.8.2. Μελέτη σε ανθρώπους.....	44
2.9. Στατιστική ανάλυση	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
3.1. Βελτιστοποίηση της μεθόδου.....	46
3.2. Μελέτη σε πειραματόζωα	47
3.2.1. Αποτελέσματα αξιολόγησης της μεθόδου	47
3.2.2. Αποτελέσματα αναλύσεων των DAPs σε δείγματα τριχών πειραματοζώων εκτιθέμενων στο dimethoate.....	50
3.2.3. Γενικές παρατηρήσεις	59
3.3. Μελέτη σε ανθρώπους.....	59
3.3.1. Αποτελέσματα αξιολόγησης της μεθόδου	59
3.3.2. Αποτελέσματα αναλύσεων των DAPs σε δείγματα τριχών ανθρώπων.....	65
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
4.1. Μελέτη σε πειραματόζωα	66
4.2. Μελέτη σε ανθρώπους.....	69
4.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της αναλυτικής μεθόδου	74
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	76
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α (ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ).....	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	82

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Γεωργικό φάρμακο ή φυτοφάρμακο είναι οποιαδήποτε χημική ουσία ή μίγμα ουσιών που έχει απωθητική, ελκυστική, τοξική, χρωμοτρόπο ή άλλη ιδιότητα και δρα προληπτικά, κατασταλτικά ή απωθητικά στους εχθρούς, στις ασθένειες, στα παράσιτα των φυτών ή στους αποθηκευμένους καρπούς τους (Γελαδάς, 1998).

Η χρήση φυτοφαρμάκων στη γεωργία έχει αναπτυχθεί τα τελευταία περίπου 60 χρόνια. Η προστασία της γεωργικής παραγωγής και η εξόντωση βλαβερών παραγόντων και ζιζανίων γινόταν εδώ και αιώνες με τη χρήση ουσιών όπως το θειάφι, η νικοτίνη, το αρσενικό, ο θειϊκός χαλκός, ενώσεις υδραργύρου και διάφορες άλλες απλές ενώσεις. Κατά το μεσοπόλεμο και το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, η ανάπτυξη της οργανικής χημείας είχε ως αποτέλεσμα τη σύνθεση καινούριων ουσιών με παρασιτοκτόνο δράση που χρησιμοποιήθηκαν στη γεωργία. Παράλληλα, η αλματώδης αύξηση του πληθυσμού της γης έκανε ουσιώδη την ανάγκη προστασίας της γεωργικής παραγωγής από τους εχθρούς της. Η επανάσταση όμως έγινε με την ανακάλυψη και στη συνέχεια χρήση των συνθετικών οργανοχλωριωμένων υδρογονανθράκων και ειδικότερα του DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane). Η επιτυχής χρήση του DDT στην καταπολέμηση των κουνουπιών και στην εξάλειψη της ελονοσίας που μεταδίδουν οδήγησε τους επιστήμονες σε διαρκή αγώνα δρόμου για την ανακάλυψη όλο και περισσότερων ουσιών όλο και περισσότερο δραστικών (Γελαδάς, 1998).

Το επόμενο βήμα των χλωριωμένων ουσιών ήταν τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα όπως το παραθείο (parathion). Τα οργανοφωσφορικά είναι μεγάλη κατηγορία εντομοκτόνων με ευρεία χρήση, πολύ αποτελεσματικά στην καταπολέμηση ενός πλήθους βλαβερών εντόμων και εύκολα αποικοδομήσιμα (γρήγορη διάσπαση) (Bardin et al., 1994; Αλμπάνης, 1999). Με την πάροδο του χρόνου προστέθηκαν και άλλες κατηγορίες εντομοκτόνων όπως τα καρβαμιδικά, τα πυρεθρινοειδή και ακολούθησαν τα ζιζανιοκτόνα. Όλες οι παραπάνω ουσίες συνέβαλαν αποφασιστικά στην αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών, ενώ

παράλληλα δημιούργησαν πολλά προβλήματα βλαπτικής επίδρασης στον άνθρωπο γιατί οι περισσότερες είναι τοξικές ουσίες (Weiss et al., 2004).

1.1. Οξείες και χρόνιες δηλητηριάσεις από φυτοφάρμακα

Κατά το παρελθόν, τα φυτοφάρμακα αντιμετωπίστηκαν μόνο από τη θετική τους πλευρά. Τα τελευταία χρόνια όμως ανακαλύπτονται οι σοβαρές αρνητικές ιδιότητες των φυτοφαρμάκων και οι άμεσες επιπτώσεις τους στην υγεία του ανθρώπου και στο οικοσύστημα. Οι κίνδυνοι που εγκυμονούν, σχετίζονται κυρίως με την οξεία και τη χρόνια τοξικότητα των ουσιών αυτών (Mansour, 2004). Ανάλογα με το χρόνο κατά τον οποίο ο οργανισμός εκτίθεται σε κάποια συγκεκριμένη τοξική ουσία και την ταχύτητα με την οποία εμφανίζεται το κλινικό πλαίσιο που έπεται αυτής της έκθεσης διακρίνονται δυο πλαίσια: η οξεία δηλητηρίαση και η χρόνια δηλητηρίαση.

Η οξεία δηλητηρίαση είναι το αποτέλεσμα της στιγμιαίας και σύντομης έκθεσης σε κάποια τοξική ουσία που είναι πολύ επιβλαβής ή όχι τόσο επιβλαβής αλλά σε μεγάλη ποσότητα, οπότε οι εκδηλώσεις είναι σχεδόν άμεσες. Αντιθέτως, η χρόνια δηλητηρίαση αποτελεί συνέπεια μιας παρατεταμένης έκθεσης σε κάποια τοξική ουσία. Στην περίπτωση αυτή, είναι πιθανό η ποσότητα της τοξικής ουσίας που εισέρχεται στον οργανισμό να είναι σχετικά χαμηλή, ωστόσο με την πάροδο του χρόνου συσσωρεύεται στο εσωτερικό του οργανισμού ή προκαλεί συσσωρευτικές βλάβες έως ότου σε κάποια δεδομένη χρονική στιγμή οι εκδηλώσεις της δηλητηρίασης να αρχίσουν να εμφανίζονται και να γίνονται σταδιακά εντονότερες (Εγκυκλοπαίδεια, Χρυσή υγεία της 3ης χιλιετίας, 2002; Ντολατζάς, 2005).

Αποτέλεσμα της οξείας τοξικότητας φυτοφαρμάκων είναι μια σειρά ατυχημάτων που συμβαίνουν στην καθημερινή μας ζωή είναι. Τα φυτοφάρμακα όταν εισάγονται σε ένα οργανισμό σε μεγάλη ποσότητα προκαλούν οξεία δηλητηρίαση με έντονα συμπτώματα και συχνά μπορούν να επιφέρουν και το θάνατο. Η ακούσια έκθεση σε φυτοφάρμακα είναι μια συνηθισμένη περίπτωση οξείας δηλητηρίασης κυρίως στα ανήλικα παιδιά (Lifshitz et al., 1999). Ωστόσο, δεν οφείλονται όλες οι δηλητηριάσεις σε ατυχήματα. Υπάρχουν αρκετά περιστατικά αυτοκτονιών με δηλητηρίαση από κάποιο γεωργικό φάρμακο (Tsatsakis et al., 1996c). Παρόλο που οι οξείες δηλητηριάσεις που προκαλούνται από κατάποση φυτοφαρμάκων έχουν

μελετηθεί εκτεταμένα (Miyazaki et al., 1989; Vasilić et al., 1992; Tsatsakis et al., 1996a; 1996b; 1996d; Lifshitz et al., 1997; Lacassie et al., 2001), η χρόνια έκθεση στις ουσίες αυτές έχει ερευνηθεί ελάχιστα.

Όσον αφορά τη χρόνια τοξικότητα, οι ανησυχίες που εκφράζονται σήμερα έχουν σχέση με τις μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο οικοσύστημα από τη συσσώρευση μικροποσοτήτων που μένουν σε αυτό μετά από κάθε εφαρμογή, και επιπλέον με τις επίσης μακροχρόνιες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία από τη συνεχή και σε μικροποσότητες λήψη φυτοφαρμάκων κυρίως μέσω της κατανάλωσης τροφίμων και νερού.

Οι χρόνιες δηλητηριάσεις διακρίνονται σε επαγγελματικές και περιβαλλοντικές, από τις οποίες προκύπτουν οι τροφογενείς (Mansour, 2004). Χρόνια περιβαλλοντική δηλητηρίαση μπορεί να συμβεί μετά από παρατεταμένη έκθεση στα παραπάνω προϊόντα ή μέσω της τροφικής αλυσίδας (Margariti et al., 2007). Τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα και το νερό προκαλούν χρόνιες δηλητηριάσεις στο γενικό πληθυσμό. Εκτός όμως από τις χρόνιες δηλητηριάσεις που συμβαίνουν μέσω της τροφής υπάρχουν και οι χρόνιες δηλητηριάσεις εξαιτίας της επαγγελματικής έκθεσης. Η εκτεταμένη χρήση φυτοφαρμάκων στη χημική φυτοπροστασία των θερμοκηπιακών και υπαίθριων καλλιεργειών έχει ως συνέπεια τη σημαντική έκθεση μεγάλου μέρους του πληθυσμού εξαιτίας της επαγγελματικής του δραστηριότητας. Στην περίπτωση αυτή, μεγάλο πρόβλημα μπορεί να προκληθεί στους χρήστες φυτοφαρμάκων κατά την παρασκευή, διακίνηση και εφαρμογή των παραπάνω ουσιών αν δεν ληφθούν οι αναγκαίες προφυλάξεις.

Πρόσφατες έρευνες που ενισχύουν την παραπάνω διαπίστωση απέδειξαν ότι ο κίνδυνος από την έκθεση στα γεωργικά φάρμακα μπορεί να είναι αυξημένος για τους εργαζόμενους στον αγροτικό τομέα καθώς επίσης και για τα παιδιά τους σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Loewenherz et al., 1997; Lu et al., 2000; O'Rourke et al., 2000; Dolapsakis et al., 2001; Curl et al., 2002; Fenske et al., 2002; Curwin et al., 2005). Επίσης, κατά τους ψεκασμούς είναι αυξημένη η τυχαία έκθεση των ανθρώπων, ιδιαίτερα αν οι κατοικίες βρίσκονται διάσπαρτες μέσα στους αγρούς ή υδρεύονται από ανοιχτές δεξαμενές ή πηγάδια.

Τα κύρια χαρακτηριστικά των επαγγελματικών ασθενειών σε χρήστες παρασιτοκτόνων είναι: επίδραση στο κεντρικό νευρικό σύστημα, δερματίτιδες, εγκαύματα και άλλες δερματικές ασθένειες, αδυναμία, ζαλάδες, παράλυση των κάτω άκρων, στομαχικές διαταραχές και ελαφρές δηλητηριάσεις, βλάβες στο αναπνευστικό

σύστημα, ερεθισμός βρόγχων και πνευμόνων, επίδραση στη λειτουργία του συκωτιού και των νεφρών, συσσώρευση στο αίμα πολλών τοξικών μεταβολιτών, μεταλλαξιγόνος και καρκινογόνος δράση (επίδραση σε αναπτυσσόμενα έμβρυα), διάφοροι καρκίνοι (προστάτη, στομάχου, λέμφωμα, πνευμόνων, στόματος, δέρματος και αναπνευστικού συστήματος), αναστολή πολλών βιολογικών λειτουργιών του ανθρώπινου σώματος, συνεργική δράση πολλών παρασιτοκτόνων με το κάπνισμα και τα οινόπνευματώδη (Αλμπάνης, 1999).

Πρέπει βεβαίως να τονιστεί ότι οι κίνδυνοι που συνδέονται με τα φυτοφάρμακα δεν είναι πλήρως γνωστοί και για πολλά από αυτά δεν έχουν μελετηθεί οι μακροχρόνιες επιπτώσεις στην υγεία, όπως βλάβη στο γενετικό υλικό, το νευρικό, το ενδοκρινικό, το ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, δεν είναι γνωστά ποια είναι τα αθροιστικά αποτελέσματα της δράσης πολλών διαφορετικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Η γνώση της επίδρασης των φυτοφαρμάκων στον άνθρωπο προέρχεται κυρίως από μελέτες σε πειραματόζωα, από μελέτες σειρών ανθρώπινων κυττάρων στο εργαστήριο (*in vitro*) και από επιδημιολογικές μελέτες.

1.2. Αξιολόγηση κινδύνου για τον άνθρωπο

Για την εκτίμηση του πιθανού κινδύνου (risk assessment) για την ανθρώπινη υγεία από την παρουσία των επικίνδυνων αυτών χημικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό, απαιτείται μεταξύ άλλων και ο συνεχής προσδιορισμός (monitoring) της παρουσίας ή μη, υπολειμμάτων των ενώσεων αυτών στα βιολογικά υλικά. Για το σκοπό αυτό χρειάζονται ευαίσθητες και αποτελεσματικές αναλυτικές μέθοδοι οι οποίες να μετρούν τα επίπεδα αυτούσιων των φυτοφαρμάκων και/ή τους μεταβολίτες τους σε βιολογικά δείγματα από επαγγελματικά και/ή μη επαγγελματικά εκτιθέμενο πληθυσμό. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη νέων μεθόδων ανάλυσης υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά δείγματα βρίσκεται στο κέντρο της επιστημονικής επικαιρότητας.

Συνήθως, ο προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων πραγματοποιείται με χρωματογραφικές τεχνικές και περιλαμβάνει πολλά προκαταρκτικά στάδια όπως τη δειγματοληψία, την εκχύλιση, τον καθαρισμό ή την απομάκρυνση των προσμείξεων. Η εκχύλιση των υπολειμμάτων των ουσιών αυτών από τα βιολογικά δείγματα δημιουργεί πολύπλοκα μίγματα, που συχνά απαιτούν καθαρισμό του δείγματος και

κατάλληλες διαδικασίες προετοιμασίας προκειμένου να απομονωθούν τα φυτοφάρμακα που εξετάζονται στη συγκεκριμένη ανάλυση. Το παρασκευασθέν δείγμα, σε όλες σχεδόν τις μεθόδους αυτές, αναλύεται στη συνέχεια ή με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας (LC) ή με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας (GC) (Barr and Needham, 2002; Margariti et al., 2007).

Για τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, που θα μας απασχολήσουν στην παρούσα εργασία, έχουν αναπτυχθεί ευαίσθητες και αποτελεσματικές αναλυτικές μέθοδοι βασιζόμενες στην τεχνική LC ή GC σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (MS), που μετρούν τα επίπεδα αυτούσιων των φυτοφαρμάκων και/ή τους μεταβολίτες τους σε διάφορα βιολογικά υλικά (όπως τρίχες, αίμα, ούρα, γαστρικό υγρό, μηκόνιο, αμνιακό υγρό) (Whyatt and Barr, 2001; Ostrea et al., 2002; Tutudaki et al., 2003; Bradman et al., 2003; Tarbah et al., 2004; Corrion et al., 2005; Dulaurent et al., 2006; Ostrea et al., 2006).

1.3. Παρασιτοκτόνα

Παρασιτοκτόνα είναι τα διάφορα φυτοφάρμακα που με βάση τη δράση τους μπορούν να καταταχθούν στις παρακάτω κατηγορίες: εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματωδοκτόνα και τρωκτικοκτόνα. Η δραστηριότητά τους ποικίλλει ανάλογα με τη χημική ομάδα στην οποία ανήκουν.

Ανάλογα με το χημικό τύπο της δραστικής ουσίας που περιέχουν τα παρασιτοκτόνα μπορούν να καταταχθούν σε διάφορες χημικές ομάδες, οι κυριότερες από τις οποίες είναι: α) χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, β) οργανοφωσφορικοί εστέρες, γ) καρβαμιδικά και αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους, δ) ενώσεις των χλωρο- και αμινο- τριαζινών, ε) ενώσεις της ομάδας των ουριών, στ) πυρεθρινοειδή και φυσικές πυρεθρίνες, ζ) φερομόνες, η) ανόργανα άλατα των μετάλλων As, Zn, Cu κ.α. (Αλμπάνης, 1999).

Στο εμπόριο, η δραστική ουσία ή οι ουσίες των παρασιτοκτόνων κυκλοφορούν σε μορφή σκόνης ή πυκνού διαλύματος που πριν χρησιμοποιηθεί πρέπει να αραιωθεί σε κάποιο διαλύτη ή αδρανές υλικό (φορέας). Κυκλοφορούν όμως και με τη μορφή σπρέι αεροζόλ (δοχείο με υπό πίεση υγρό διάλυμα που μετά από εκνέφωση διαμορφώνει αεροζόλ). Στην περίπτωση των διαλυμάτων ή μιγμάτων, ανάλογα με το βαθμό αραιώσης ελαττώνεται και το μέγεθος της τοξικότητας.

Τα φυτοφάρμακα παρέχονται στα φυτά κυρίως με τέσσερεις τρόπους: 1) σαν ψεκαζόμενο υδατικό διάλυμα, 2) με τη μορφή ατμών, 3) σαν υδατικό διάλυμα με το οποίο ποτίζεται η ρίζα του φυτού και 4) με τη μορφή σκόνης (πασπάλισμα). Οι δύο πρώτοι τρόποι θεωρούνται σαν οι πλέον επικίνδυνοι για τον εργαζόμενο που τους εφαρμόζει.

Τα φυτοφάρμακα, μετά την εφαρμογή τους στα φυτά ή στο έδαφος, υφίστανται μια σειρά φυσικών, χημικών και βιολογικών διαδικασιών (όπως υδρόλυση, οξειδωση, διάσπαση, μεταφορά, εξάτμιση, ριζική πρόσληψη από τα φυτά κ.α.) και αρχίζουν να ρυπαίνουν το έδαφος, τα νερά των ποταμών, των λιμνών και των θαλασσών. Έτσι, είναι δυνατόν να εμφανισθούν σε επικίνδυνες συγκεντρώσεις στα τρόφιμα, το γάλα και τα λιπαρά μέρη του σώματος του ανθρώπου (Αλμπάνης, 1999).

Οι τοξικές ουσίες απομακρύνονται από τον οργανισμό είτε αναλλοίωτες είτε με τη μορφή των παραγώγων τους (μεταβολιτών) (Δημητρίου, 2001). Κατά το βιομετασχηματισμό μιας ουσίας, τα παράγωγα που σχηματίζονται (μεταβολίτες) είναι μικρότερα μόρια συνήθως λιγότερο τοξικά και πιο υδατοδιαλυτά από τις αρχικές ουσίες, με αποτέλεσμα να αποβάλλονται ευκολότερα από τον οργανισμό. Η απομάκρυνση καλείται απέκκριση και γίνεται κυρίως από τα ούρα (μέσω των νεφρών), τα κόπρανα (μέσω της χολής), το σάλιο, τον ιδρώτα του δέρματος, τα νύχια, τα μαλλιά, το δέρμα και τον εκπνεόμενο αέρα. Η απέκκριση των τοξικών ουσιών μπορεί να γίνει και από το μητρικό γάλα με το θηλασμό (Garrett, 1987).

Σημαντικός παράγοντας στην απέκκριση των φυτοφαρμάκων είναι η αθροιστική δράση που παρουσιάζουν. Αυτό σημαίνει ότι εμφανίζονται διάφορες βιολογικές αλλαγές ύστερα από επανειλημμένες λήψεις ακόμα και αν αυτές είναι πολύ μικρές. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ενώ μια ουσία εισάγεται καθημερινά στον οργανισμό έστω και σε ελάχιστες ποσότητες, αποβάλλεται πολύ αργά από αυτόν, έτσι ώστε μετά την πάροδο ενός ορισμένου χρονικού διαστήματος έχει συσσωρευτεί η ουσία αυτή σε ικανή ποσότητα ώστε να την καθιστά βιολογικά δραστική. Έτσι εξηγούνται οι χρόνιες δηλητηριάσεις που συμβαίνουν σε εργαζόμενους από τη χρήση φυτοφαρμάκων και εμφανίζονται μετά από μακρόχρονη εργασία (Δημητρίου, 2001).

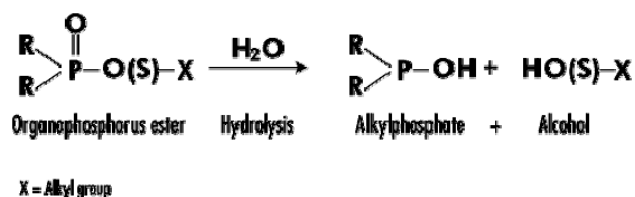
1.3.1. Οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα

Τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα (π.χ. chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, dimethoate, ethion, fenthion, malathion, methyl parathion, parathion, phosmet) είναι συνθετικές οργανικές ενώσεις του φωσφόρου (ο γενικός χημικός τους τύπος φαίνεται στις Εικόνες 1.1 και 1.2), που χρησιμοποιούνται ευρέως ως εντομοκτόνα στα φυτά και ως παρασιτοκτόνα στα ζώα (Bardin et al., 1994).

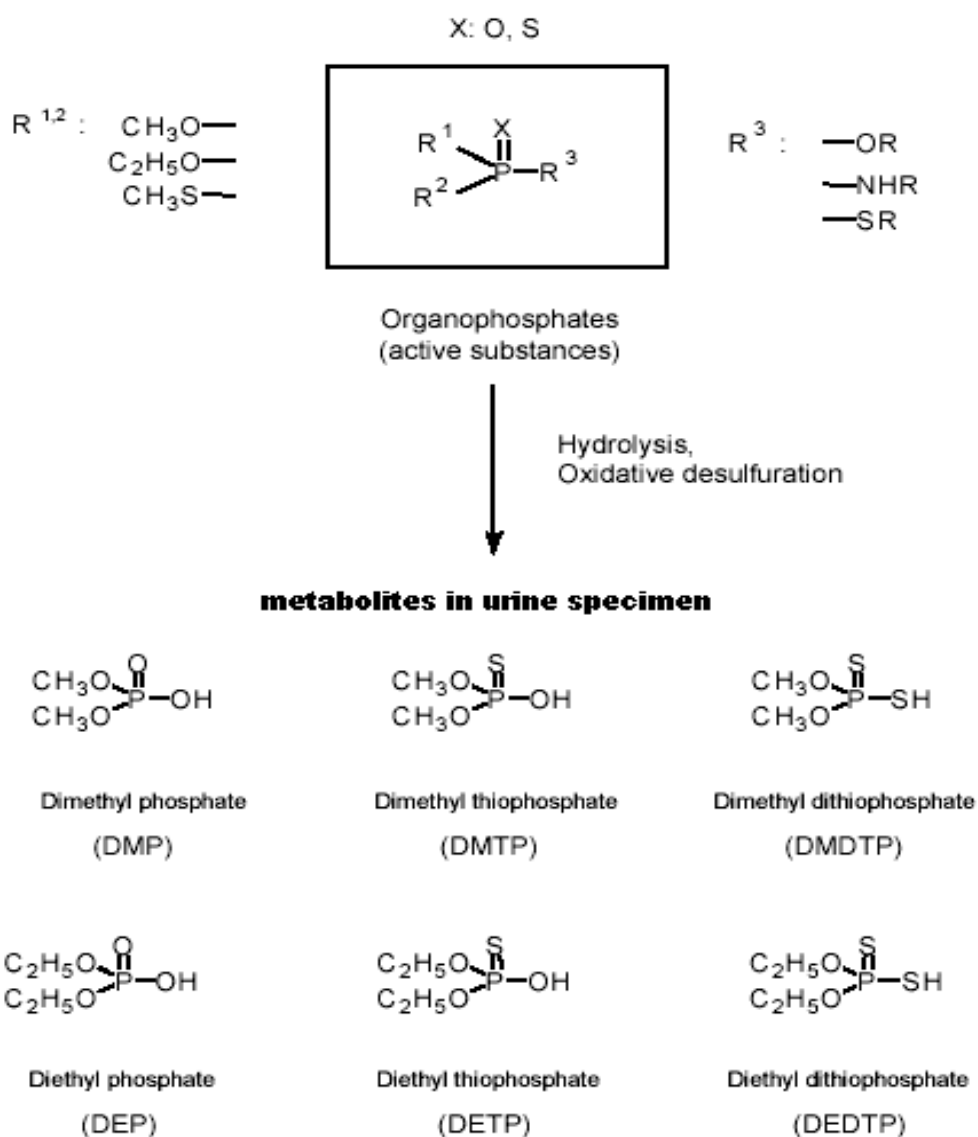
Τα μισά περίπου οργανικά εντομοκτόνα ανήκουν στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών. Όλα σχεδόν τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα έχουν δυσάρεστη οσμή, κυκλοφορούν σε σπρέι, σκόνες, γαλακτώματα ή κοκκώδεις μορφές και οι μεταβολίτες τους αποβάλλονται από τους νεφρούς (Bicker et al., 2005; Μαυροματίδης, 2009). Είναι ενώσεις μεγάλης τοξικότητας, σχετικά ασταθή σε αλκαλικό περιβάλλον και έχουν μικρό βαθμό βιοσυσσωρευσης. Τα υπολείμματά τους στα τρόφιμα προκαλούν χρόνιες δηλητηριάσεις (Αλμπάνης, 1999). Τα οργανοφωσφορικά είναι νεώτερα προϊόντα και θεωρούνται και πιο δραστικά αλλά και πιο εύκολα αποικοδομήσιμα, ενώ η τοξική τους δράση στους ανθρώπους ποικίλλει και γενικά εμφανίζουν υψηλότερη τοξικότητα από τα οργανοχλωριωμένα (Γελαδάς, 1998).

Τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε αγροτικές περιοχές όπως είναι η Κρήτη (Dolapsakis et al., 2001). Είναι γνωστό και γενικά παραδεκτό ότι στην Ελλάδα, και ειδικότερα στην Κρήτη, η χρήση των φυτοφαρμάκων είναι μη ελεγχόμενη και τα άτομα που τα χρησιμοποιούν συνήθως δεν είναι ενημερωμένα για του κινδύνους που εγκυμονεί η χρήση τους χωρίς τις απαραίτητες προφυλάξεις. Τα φυτοφάρμακα που κυρίως χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες είναι οργανοφωσφορικές και καρβαμιδικές ενώσεις. Οι τριαζίνες, τα πυρεθρινοειδή και άλλες χημικές ουσίες όπως το paraquat, το diquat και το μεθυλοβρωμίδιο χρησιμοποιούνται σε μικρότερες ποσότητες.

Στην έρευνά μας επιλέξαμε να ασχοληθούμε με τα οργανοφωσφορικά εξαιτίας της ευρείας χρήσης τους στην περιοχή της Κρήτης σαν εντομοκτόνα και του πλήθους των ατυχημάτων που έχουν προκληθεί εξαιτίας της μεγάλης τους τοξικότητας (Tsatsakis et al., 1996c).



Εικόνα 1.1. Υδρόλυση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (Maroni and Ferioli, 1998).



Εικόνα 1.2. Γενικές χημικές δομές των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων και των μεταβολιτών τους στα ούρα (Heudorf and Angerer, 2001).

Το πρόβλημα των δηλητηριάσεων με οργανοφωσφορικά είναι οξύ και παγκόσμιο. Στην Ελλάδα, το 1999 καταγράφηκαν 1700 περιστατικά δηλητηριάσεων με γεωργικά φάρμακα και τα 556 από αυτά είχαν προκληθεί από οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Κέντρο Δηλητηριάσεων, 1999). Κάθε χρόνο αναφέρονται παγκοσμίως περίπου τρία εκατομμύρια περιστατικά δηλητηριάσεων από οργανοφωσφορικά και περίπου 200000 άνθρωποι χάνουν τη ζωή τους (Haywood and Karalliedde, 2000). Η Αμερικανική Ένωση Κέντρων Δηλητηριάσεων (American Association of Poison Control Centers) κατέγραψε 86914 περιστατικά δηλητηριάσεων σε οργανοφωσφορικά το 2000. Το ένα πέμπτο των περιπτώσεων αυτών ήταν επαγγελματικές δηλητηριάσεις και το ποσοστό θνησιμότητας ήταν ελαφρώς μικρότερο από το 1% (Trump and EMT-P, 2001).

Από το σύνολο των δηλητηριάσεων ένα σημαντικό ποσοστό καλύπτεται από απόπειρες αυτοκτονίας. Το 2000, το ποσοστό των δηλητηριάσεων που οφείλονταν σε απόπειρες αυτοκτονίας ήταν πάνω από το 90% σε ολόκληρο τον κόσμο και παρατηρήθηκε σε νέα γενικά άτομα με μέση ηλικία 25 ετών και με ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ 4 και 30% μεταξύ αυτής της ομάδας περιπτώσεων. Αυτά τα στατιστικά δεδομένα έχουν διαμορφωθεί σε μεγάλο βαθμό από τις αναπτυσσόμενες γεωργικές χώρες του τρίτου κόσμου που έχουν άμεση πρόσβαση σε εντομοκτόνα όπως η Σρι Λάνκα.

Τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα απορροφούνται αμέσως από το δέρμα, τους πνεύμονες και το γαστρεντερικό σωλήνα, και μεταφέρονται στο αίμα και στους ιστούς του ανθρώπινου σώματος. Οι ουσίες αυτές εμποδίζουν τη δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, προκαλώντας τη συσσώρευση της ουσίας ακετυλοχολίνης μεταξύ νεύρων και μυών (νευρομυϊκές συνάψεις) και, κατά συνέπεια, τη μη κανονική λειτουργία του νευρικού συστήματος (Ballantyne and Marrs, 1992; Mileson et al., 1998) με, όπως θα δούμε στη συνέχεια, πολύ επικίνδυνες επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Η σύνδεση του οργανοφωσφορικού εστέρα με το ένζυμο αυτό είναι σταθερή, η δε πραλιδοξίμη αποτελεί την ουσία που μπορεί και αντιστρέφει την παραπάνω σύνδεση (ATSDR, 1997; Aaron and Howland, 1998; Μαυροματίδης, 2009). Τα παιδιά και τα βρέφη είναι πιθανό να είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα στις βλαβερές συνέπειες των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων λόγω των μειωμένων μεταβολικών τους δυνατοτήτων (ATSDR, 1997; U.S. EPA, 2000; Costa et al., 2005).

1.3.1.1. Δηλητηρίαση με οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα

Η δηλητηρίαση με οργανοφωσφορικούς εστέρες προκαλεί ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων ενδεικτικών χολινεργικής υπερδιέγερσης. Η αδρανοποίηση της ακετυλοχολινεστεράσης επιτρέπει τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων ακετυλοχολίνης, με αποτέλεσμα: α) την παρασυμπαθητικοτονία (μύση, διέγερση λείων μυϊκών ινών εντέρου, σιελόρροια, διέγερση ιδρωτοποιών αδένων, σπασμός λείων μυϊκών ινών των βρόγχων, σύσπαση μυών της ουροδόχου κύστεως και βραδυκαρδία), β) την επίμονη αποπόλωση των σκελετικών μυών (με αποτέλεσμα ινιδισμό και παράλυση), γ) την αρχική διέγερση, που ακολουθείται από καταστολή του κεντρικού νευρικού συστήματος, με αποτέλεσμα την καταστολή του αναπνευστικού κέντρου και τη σύγχυση, δ) την ποικίλου βαθμού διέγερση των γαγγλίων, με αποτέλεσμα την αύξηση ή μείωση της αρτηριακής πίεσης και τη μυδρίαση ή μύση της κόρης του οφθαλμού και νεφρική βλάβη (οξεία σωληναριακή νέκρωση) (Abend et al., 1994; Betrosian et al., 1995).

Τα πρώιμα συμπτώματα μετά την είσοδο της ουσίας στον οργανισμό (με εισπνοή, απορρόφηση από το δέρμα ή κατάποση του δηλητηρίου) εμφανίζονται μέσα σε 30-60 min και φτάνουν στο ανώτερο επίπεδο (peak) μετά από 2-8 ώρες. Οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις της δηλητηρίασης περιλαμβάνουν διαταραχές από τα μάτια, δυσκολία στην αναπνοή και υπερδραστηριότητα του γαστρεντερικού σωλήνα. Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα με τα οποία παρουσιάζονται οι ασθενείς είναι η μύση, η δακρύρροια, η σιελόρροια, οι διάρροιες, οι αυξημένες εκκρίσεις στους βρόγχους και η βραδυκαρδία. Ακόμη, αυτοί έχουν μυϊκό ινιδισμό, ναυτία, εμέτους, αταξία, τονικοκλονικούς σπασμούς, αναπνευστική ανεπάρκεια και κόμα (Hatjjan et al., 2000). Ο θάνατος οφείλεται σε πνευμονικό οίδημα και αναπνευστική ανεπάρκεια (Eddleston et al., 2005; Μαυροματίδης, 2009).

Στην οξεία δηλητηρίαση με οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, οι κλινικές εκδηλώσεις εξαρτώνται από τη βαρύτητά της. Σε ήπια δηλητηρίαση υπάρχει ανορεξία, κεφαλόπονος, αδυναμία, ανησυχία, δυσφορία στο στήθος, τρόμος στη γλώσσα και τα βλέφαρα, μύση και μείωση της οπτικής οξύτητας. Σε μέτρια υπάρχει ναυτία, σιελόρροια, δακρύρροια, συσπάσεις στην κοιλιακή χώρα, έμετοι, επιδρώσεις και μυϊκός ινιδισμός. Σε σοβαρή δηλητηρίαση παρατηρείται διάρροια, έντονη μύση και κόρες που δεν αντιδρούν στα ερεθίσματα, αναπνευστική δυσχέρεια, πνευμονικό

οίδημα, κυάνωση, απώλεια ελέγχου των σφυγκτήρων, σύγχυση, κώμα και καρδιακοί αποκλεισμοί.

Εργαστηριακά διαπιστώνονται στους ασθενείς μειωμένα επίπεδα χολινεστεράσης ορού και ερυθροκυττάρων. Επίπεδα χολινεστεράσης γύρω στο 30-50% της φυσιολογικής τιμής, αποτελούν ένδειξη δηλητηρίασης από οργανοφωσφορικά (Ellenhorn and Barceloux, 1988), ενώ συμπτώματα εμφανίζουν οι ασθενείς, όταν αυτά μειωθούν κάτω από το 20% του φυσιολογικού. Πρέπει να γίνουν ωστόσο πολλοί προσδιορισμοί για να γίνει έκδηλη η μεταβολή των επιπέδων τους στην πορεία του χρόνου. Υπεργλυκαιμία και οξεία παγκρεατίτιδα (αύξηση αμυλάσης) έχουν επίσης παρατηρηθεί (Winchester et al., 1977).

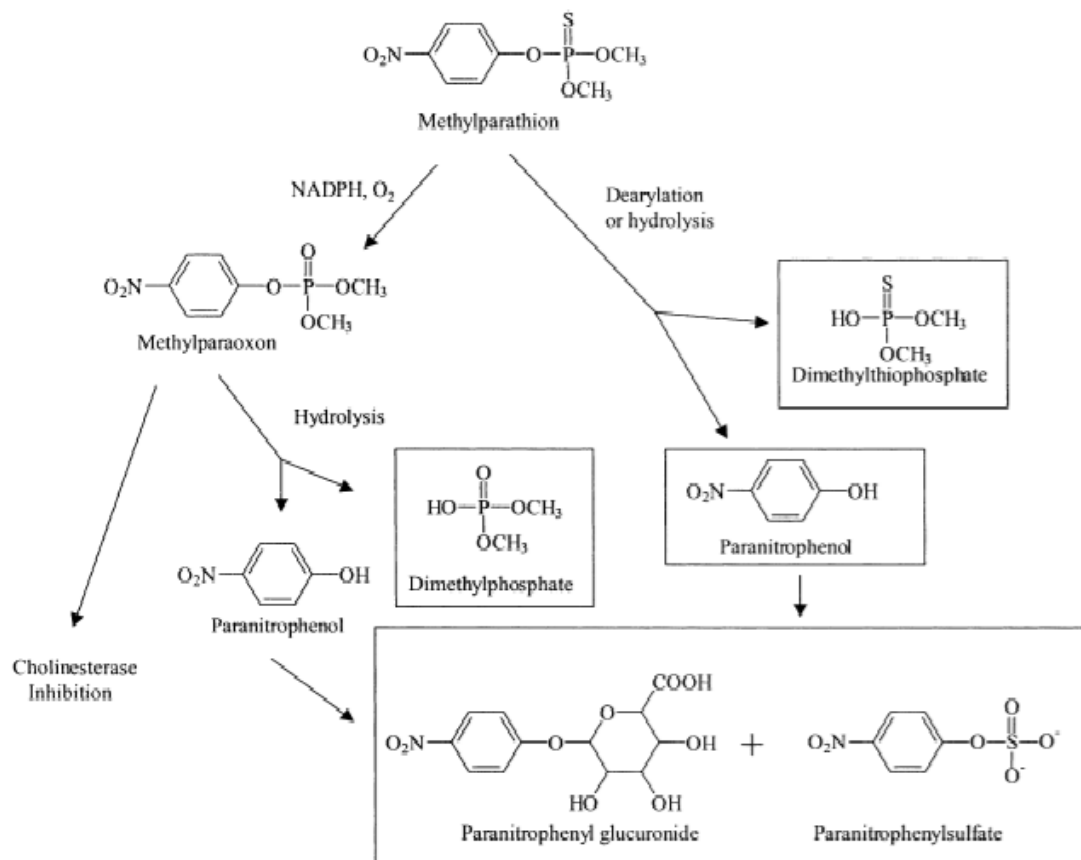
Στη χρόνια δηλητηρίαση από οργανοφωσφορικά παρατηρείται υπερβολική έκκριση και περισταλτικότητα των εντέρων, γενικευμένη αδυναμία και μυϊκή αδυναμία, απώλεια μνήμης, αϋπνία, έντονη κατάθλιψη, σύγχυση, βραδύς χρόνος αντίδρασης, υπνηλία, κεφαλαλγία, απώλεια προσανατολισμού, ευερεθιστικότητα, προβλήματα στην ομιλία, υπνοβασία και εφιάλτες (Hatjian et al., 2000; Barr and Angerer, 2006). Χρόνια επαναλαμβανόμενη έκθεση είναι δυνατόν να δημιουργήσει συμπτώματα που μοιάζουν με αυτά της γρίπης. Η έκθεση σε μικρές ποσότητες από οργανοφωσφορικούς εστέρες μπορεί να προκαλέσει εκδήλωση συμπτωμάτων που δεν θα εκδηλώνονταν σε κανονικά επίπεδα ενζύμου. Απώτερες επιπλοκές περιλαμβάνουν ψυχολογικές και νευρολογικές εκδηλώσεις (Ray, 1998; Lotti, 2001; Thrasher et al., 2002; Salvi et al., 2003). Επιπλέον, για ορισμένες ουσίες της κατηγορίας αυτής υπάρχουν ενδείξεις ότι έχουν την ικανότητα να επηρεάσουν την αναπαραγωγική λειτουργία βιολογικών οργανισμών, προκαλώντας προβλήματα στην αναπαραγωγή (Exttoxnet, 1996; Kamijima et al., 2004; Okamura et al., 2005) και ανάπτυξη διαφόρων ζώων (IPCS, 1996) και τερατογένεση (U.S. Public Health Service, 1995). Ακόμη, υπάρχουν ορισμένες ουσίες της κατηγορίας αυτής με ικανότητα μεταλλαξιογόνου δράσης (mutagenicity) (U.S. EPA, 2006).

1.3.1.2. Μεταβολισμός οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων

Τα φυτοφάρμακα της κατηγορίας αυτής μεταβολίζονται αρκετά γρήγορα στον ανθρώπινο οργανισμό (Gallo and Lawryk, 1991). Οι ενώσεις αυτές αποτελούνται από ένα φωσφορικό (phosphate) (ή phosphoro thioate ή phosphoro dithioate) τμήμα, το οποίο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι *O,O*-διαλκυλ-

υποκατεστημένο από αλκυλομάδες (dimethyl ή diethyl), και κάποιο οργανικό τμήμα που είναι χαρακτηριστικό για κάθε φυτοφάρμακο. Μόλις εισέλθει στον οργανισμό το οργανοφωσφορικό φάρμακο, μετατρέπεται με τη δράση ενζύμων στο αντίστοιχο οξύ (oxon), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με τη διαθέσιμη χολινεστεράση (Barr and Needham, 2002; Wessels et al., 2003; Barr et al., 2004). Το προκύπτων οξύ μπορεί επίσης να υποστεί ενζυμική ή αυθόρμητη υδρόλυση προς έναν dialkyl phosphate (DAP) μεταβολίτη και το χαρακτηριστικό οργανικό τμήμα (specific metabolite). Αν το φυτοφάρμακο δεν μετατραπεί στο οξύ, μπορεί να υδρολυθεί προς τον αντίστοιχο χαρακτηριστικό μεταβολίτη και dialkyl thionate (dialkyl thiophosphate και/ή dialkyl dithiophosphate) μεταβολίτες. Αυτή η μεταβολική πορεία απεικονίζεται στην Εικόνα 1.3, χρησιμοποιώντας το methyl parathion ως αντιπροσωπευτικό οργανοφωσφορικό φυτοφάρμακο.

Μέσω της υδρόλυσης και της οξειδωτικής αποθείωσης (αντικατάστασης στο ήπαρ του θείου με οξυγόνο), σχεδόν όλα τα φυτοφάρμακα της κατηγορίας αυτής μεταβολίζονται σε έναν ή περισσότερους από τους ακόλουθους μη χαρακτηριστικούς (κοινούς, common) DAP μεταβολίτες: dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), dimethyl thiophosphate (DMTP), diethyl thiophosphate (DETP), dimethyl dithiophosphate (DMDTP) και diethyl dithiophosphate (DEDTP) (Εικόνα 1.1 και 1.2) (Nutley and Cocker, 1993; Bravo et al., 2002). Αυτοί οι μεταβολίτες είναι πολύ πολικοί, όξινοι και υδατοδιαλυτοί, και συχνά μετρούνται ως δείκτες της έκθεσης του ανθρώπου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Reid and Watts, 1981; Davies and Peterson, 1997; Loewenherz et al., 1997; Hardt and Angerer, 2000; Oglobline et al., 2001; Barr et al., 2004; Bravo et al., 2004).



Εικόνα 1.3. Μεταβολική πορεία του methyl parathion στον οργανισμό (αντιπροσωπεύει το μεταβολισμό των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων) (Barr and Needham, 2002).

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

1.4. Μέθοδοι προσδιορισμού της έκθεσης σε φυτοφάρμακα

Διάφορες τεχνικές έχουν εφαρμοστεί για την ανάλυση των φυτοφαρμάκων και των κύριων μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα. Ως επί το πλείστον, οι μέθοδοι αυτοί έχουν μια κοινή διαδικασία που περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια: 1) την προετοιμασία του δείγματος με στόχο την απομόνωση, την προσυγκέντρωση, και μερικές φορές την παραγωγοποίηση των προσδιοριζόμενων ουσιών, 2) την ανάλυση του επεξεργασμένου δείγματος στο αναλυτικό όργανο, και 3) την επεξεργασία των καταγραμμένων χρωματογραφημάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων. Οι

περισσότερες από αυτές τις μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί για την παρακολούθηση της χρόνιας επαγγελματικής και/ή περιβαλλοντικής έκθεσης του ανθρώπου σε επιδημιολογικές και άλλες κλινικές μελέτες ή για τοξικολογικές αναλύσεις, και έχουν εφαρμοστεί σε διάφορα βιολογικά υποστρώματα, όπως στα ούρα, στο αίμα, στον ορό του αίματος, στο πλάσμα του αίματος, στο μηκόνιο, στο μητρικό γάλα και στο αμνιακό υγρό (Margariti et al., 2007).

Τα τελευταία χρόνια, για την ανάλυση των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων ή μεταβολιτών τους σε βιολογικά υλικά έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνολογίες με σκοπό την ανάπτυξη και εφαρμογή πιο αποτελεσματικών διαδικασιών, ούτως ώστε να αυξηθεί η ακρίβεια και να μειωθεί ο χρόνος ανάλυσης, το κόστος εργασίας, η μόλυνση του περιβάλλοντος, και η έκθεση των αναλυτών στις τοξικές χημικές ουσίες. Έτσι, ένα πλήθος αναλυτικών τεχνικών έχουν εφαρμοστεί και εδώ περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων τεχνικές όπως η GC-MS, η GC σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS), η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με απλή (LC-MS) και διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Συνήθως, το βήμα-κλειδί στις αναλυτικές διαδικασίες δεν είναι η ίδια η ανάλυση στο αναλυτικό όργανο αλλά η προετοιμασία του δείγματος προκειμένου να απομονωθούν από το δείγμα οι ουσίες που εξετάζονται στη συγκεκριμένη ανάλυση. Τα τελευταία χρόνια, διάφορες διαδικασίες έχουν αναπτυχθεί που έχουν αυτό το σκοπό και περιλαμβάνουν υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE), εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) και μικροεκχύλιση (microextraction). Στις αναλυτικές μεθόδους που στηρίζονται στις προαναφερόμενες τεχνικές, ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί στην απλοποίηση, ελαχιστοποίηση και βελτίωση των σταδίων εκχύλισης και καθαρισμού, που είναι συνήθως τα πιο χρονοβόρα και πολυδάπανα στάδια στην ανάλυση των ενώσεων αυτών.

Οι πολυυπολειμματικές (multiresidue) αναλυτικές μέθοδοι, με τις οποίες ταυτοποιούνται και προσδιορίζονται ποσοτικά όσο το δυνατόν περισσότερα γεωργικά φάρμακα και/ή τα προϊόντα αποικοδόμησής τους σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (trace level determination), είναι οι πιο συνηθισμένες από τις μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί πρόσφατα για τη μέτρηση φυτοφαρμάκων σε βιολογικά δείγματα. Ωστόσο, η ανάπτυξη τέτοιων πολυυπολειμματικών μεθόδων για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων διαφορετικών κατηγοριών είναι ένα δύσκολο έργο γιατί ουσίες με διαφορετικές πολικότητες, διαλυτότητες, πτητικότητες και τιμές pKa πρέπει να εξαχθούν ταυτοχρόνως και να αναλυθούν. Η φασματομετρία μάζας είναι μια

ιδιαιτέρως ευαίσθητη, γενικής χρήσης, αλλά παράλληλα εκλεκτική τεχνική ανίχνευσης κατάλληλη και για πολυϋπολειμματική ανίχνευση και για ανάλυση ενός ευρέως φάσματος φυτοφαρμάκων σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Margariti et al., 2007).

Η τεχνική GC-MS ήταν από τις πρώτες που χρησιμοποιήθηκε για τη βιοπαρακολούθηση των φυτοφαρμάκων και κατόπιν ακολούθησε η τεχνική GC-MS/MS. Το σύστημα διαδοχικής φασματομετρίας μάζας, λόγω της αυξημένης εκλεκτικότητάς του (De Hoffmann, 1996; Moreno Frías et al., 2001), μειώνει τις παρεμβολές στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γεωργικών φαρμάκων, που προέρχονται από άλλα συστατικά του δείγματος, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται καλύτερα όρια ανίχνευσης.

Ωστόσο, ο αριθμός των ουσιών ή προϊόντων αποικοδόμησης που παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάλυσή τους με την τεχνική GC, λόγω της χαμηλής πτητικότητάς τους (δεν είναι αρκετά πτητικές για να αναλυθούν με αέρια χρωματογραφία), της υψηλής πολικότητάς τους, και/ή της θερμικής αστάθειάς τους στις συνήθεις θερμοκρασίες λειτουργίας της αερίου χρωματογραφίας, έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια. Από τις τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση γεωργικών φαρμάκων, η τεχνική LC επιτρέπει την ανάλυση μη πτητικών και θερμικά ασταθών ενώσεων, καθώς επίσης και ουσιών των οποίων η ανάλυση με GC δεν παρουσιάζει προβλήματα (Hogendoorn and van Zoonen, 2000).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν φασματομετρία μάζας σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφική ανάλυση για τη βιοπαρακολούθηση της έκθεσης στα φυτοφάρμακα συγκεντρώνουν ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν LC-MS/MS σε συνδυασμό με πηγή ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure ionization, API), κυρίως πηγή χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) και πηγή ηλεκτροψεκασμού (electrospray), φαίνεται να προσφέρουν υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα και καθιστούν δυνατή την ανίχνευση των ουσιών σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα βιολογικά δείγματα (Hernández et al., 2002; Olsson et al., 2003; 2004; Hernández et al., 2004; Norrgran et al., 2006). Αυτές οι τεχνικές καθιστούν δυνατή, σε κάποιες περιπτώσεις, την απευθείας ανάλυση του δείγματος χωρίς να απαιτείται κάποια διαδικασία προετοιμασίας και καθαρισμού του δείγματος πριν από την ανάλυσή του (Hernández et al., 2002; 2004). Το κόστος των συστημάτων αυτών όμως παραμένει ακόμα πολύ υψηλό πράγμα που καθιστά την τεχνολογία αυτή μη προσπελάσιμη στα εμπλεκόμενα εργαστήρια.

1.4.1. Μέθοδοι προσδιορισμού της έκθεσης σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα

Για την εκτίμηση της έκθεσης του οργανισμού σε φυτοφάρμακα συνήθως αναλύονται τα ούρα ή το αίμα (Barr and Needham, 2002; Margariti et al., 2007), και μερικές φορές σε νεκροτομικά δείγματα μετρούνται τα επίπεδα των φαρμάκων στους ιστούς. Όμως, τα φυτοφάρμακα και οι μεταβολίτες τους στο αίμα και στα ούρα μένουν για μικρό χρονικό διάστημα (μερικές ώρες και μερικές ημέρες, αντίστοιχα) και, κατά συνέπεια, η ανάλυση αυτών των υποστρώματων δείχνει μόνο την πρόσφατη έκθεση. Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον των επιστημόνων για την αναζήτηση μεθόδων ανίχνευσης των φυτοφαρμάκων σε υποστρώματα άλλα από τα συμβατικά ώστε να εκτιμηθεί ένα πολύ μεγαλύτερο ιστορικό της έκθεσης συνεχίζεται αδιάκοπα. Αυτό ισχύει κυρίως για τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα (Liu and Pleil, 2002; Tutudaki et al., 2003), που, όπως έχει προαναφερθεί, μεταβολίζονται και αποβάλλονται αρκετά γρήγορα (Gallo and Lawryk, 1991) από τα υγρά του σώματος, καθιστώντας έτσι αυτά τα υποστρώματα λιγότερο χρήσιμα για την ανίχνευση της μακροχρόνιας έκθεσης του οργανισμού στις ενώσεις αυτές.

Ο προσδιορισμός του επιπέδου της έκθεσης του οργανισμού στα οργανοφωσφορικά είναι αναγκαίος προκειμένου να αξιολογούνται οι πιθανοί κίνδυνοι για την υγεία από τη χρήση τους και να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα πρόληψης για τον ανθρώπινο πληθυσμό, ώστε να μειώνονται ή και να εξαλείφονται οι βλαβερές επιπτώσεις από τη χρήση τους. Ο πιο συνηθισμένος δείκτης έκθεσης στις παραπάνω ενώσεις είναι η μέτρηση της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης (He et al., 2002). Είναι όμως γενικά παραδεκτό ότι αυτός δεν είναι ιδιαίτερα ασφαλής δείκτης, ειδικά σε περιπτώσεις χρόνιας και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης, αν και είναι πολύ χρήσιμος σε περιπτώσεις αξιολόγησης της οξείας δηλητηρίασης. Έτσι, προκειμένου να αξιολογηθεί το μέγεθος της έκθεσης στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, μετρούνται τα επίπεδα των ενώσεων αυτών ή τα διάφορα προϊόντα αποικοδόμησής τους. Στην περίπτωση αυτή, ο προσδιορισμός των μεταβολιτών που προέρχονται από το αλκυλοφωσφορικό τμήμα του οργανοφωσφορικού μορίου ή των καταλοίπων που δημιουργούνται από την υδρόλυση του δεσμού P-X (Εικόνα 1.1), χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της έκθεσης.

Πιο συγκεκριμένα, προκειμένου να αξιολογηθεί το μέγεθος της έκθεσης στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα ένα πλήθος μεθόδων έχουν αναπτυχθεί μέχρι τώρα

(Πίνακας 1.1). Οι κυριότερες από αυτές είναι η μέτρηση των υπολειμμάτων αυτούσιων των φυτοφαρμάκων στο αίμα (Corrion et al., 2005), στον ορό του αίματος (Lacassie et al., 2001; Pitarch et al., 2003), στο μηκόνιο (Ostrea et al., 2002; Bielawski et al., 2005) και στους ιστούς (Richardson and Seiber, 1993), των χαρακτηριστικών μεταβολιτών τους (specific organophosphate metabolites) στα ούρα (Koch and Angerer, 2001; Olsson et al., 2003), στο αμνιακό υγρό (Bradman et al., 2003), στο μηκόνιο (Bielawski et al., 2005) και στο αίμα (Corrion et al., 2005), καθώς και η μέτρηση των DAP μεταβολιτών τους σε διάφορα βιολογικά υλικά, όπως στα ούρα (Hernández et al., 2002; Bravo et al., 2004; Dulaurent et al., 2006; Ueyama et al., 2006), στο πλάσμα του αίματος (Drevenkar et al., 1994), στο γαστρικό υγρό (Tarbah et al., 2004), στους ιστούς (Richardson and Seiber, 1993), στο αμνιακό υγρό (Bradman et al., 2003) και στο μηκόνιο (Whyatt and Barr, 2001). Οι έξι μη χαρακτηριστικοί DAP μεταβολίτες που μετρούνται σε βιολογικά δείγματα είναι οι DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP και DEDTP. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ανίχνευση των DAPs δείχνει έκθεση του οργανισμού σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα αλλά δεν μπορεί να προσδιορίσει έκθεση σε κάποια συγκεκριμένη ουσία.

Οι μέθοδοι ανάλυσης που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια επιτρέπουν, στις περισσότερες περιπτώσεις, την ταυτόχρονη ανίχνευση και των έξι DAPs (Hardt and Angerer, 2000; Whyatt and Barr, 2001; Oglobline et al., 2001; Bravo et al., 2002; Bradman et al., 2003; Bravo et al., 2004; Dulaurent et al., 2006). Για την ανάλυση των DAPs στα βιολογικά δείγματα με την τεχνική GC-MS συνήθως απαιτείται πριν από την ανάλυση του δείγματος ένα στάδιο απομόνωσης των μεταβολιτών που περιέχονται στο δείγμα και κατόπιν παραγωγοποίησή τους. Η απομόνωση τους από το αναλυόμενο υπόστρωμα αποτελεί ένα από τα πιο ενδιαφέροντα στάδια στην ανάλυση των ουσιών αυτών. Η εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE) με πολικούς διαλύτες (Hardt and Angerer, 2000; Dulaurent et al., 2006; Ueyama et al., 2006), η αζεοτροπική απόσταξη (azeotropic distillation) με ακετονιτρίλιο (Bravo et al., 2002) και η στερεή-υγρή εκχύλιση (Solid-Liquid Extraction) λυοφιλιμένων (lyophilized) δειγμάτων ούρων (Oglobline et al., 2001; Bravo et al., 2004) είναι τυπικές τεχνικές απομόνωσης των DAPs που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Η χρήση ισοτόπων αναλόγων (isotopically labeled analogues) ως εσωτερικά πρότυπα (internal standards) για κάθε ένα από αυτούς τους μεταβολίτες

επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της ανάκτησης, με αποτέλεσμα η μεθοδολογία να παρουσιάζει πολύ καλή ακρίβεια και επαναληπτικότητα (Bravo et al., 2002; 2004).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που στηρίζονται στην τεχνική LC-MS/MS (Hernández et al., 2002; 2004; Dulaurent et al., 2006) για την ανίχνευση των DAPs στα ούρα (Πίνακας 1.1). Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή επιτρέπει την απευθείας εισαγωγή δειγμάτων ούρων στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας και ταχεία ανίχνευση των DAPs (Hernández et al., 2002; 2004). Η μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα καθώς και η ταχύτητα ανάλυσης είναι σημαντικά χαρακτηριστικά των συστημάτων αυτών. Επιπλέον, στις μεθόδους αυτές επειδή δεν απαιτούνται πολλά προκαταρκτικά στάδια (όπως καθαρισμός ή παραγωγοποίηση), οι συνήθεις εργαστηριακές εργασίες προετοιμασίας του δείγματος περιορίζονται στο ελάχιστο, με αποτέλεσμα το σφάλμα, λόγω απωλειών στο δείγμα, να είναι μικρότερο. Όμως, όπως ήδη αναφέρθηκε, μειονεκτούν έναντι των συστημάτων GC-MS ως προς το μεγαλύτερο κόστος.

Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια, όπως ήδη αναφέρθηκε, υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για τη βελτίωση των μεθοδολογιών παρακολούθησης φυτοφαρμάκων (συμπεριλαμβανομένου και των οργανοφωσφορικών) σε υποστρώματα άλλα από τα συμβατικά. Η ικανότητα ανίχνευσης φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών σε νέα υποστρώματα όπως είναι το μηκόνιο και το αμνιακό υγρό αποδεικνύει ότι αυτά τα υποστρώματα είναι χρήσιμα για τη βιοπαρακολούθηση περιβαλλοντικών μολυντών. Η μέτρηση των φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους στο μηκόνιο (Whyatt and Barr, 2001; Ostrea et al., 2002; Bielawski et al., 2005; Ostrea et al., 2008) και στο αμνιακό υγρό (Bradman et al., 2003), τα οποία παράγονται από το έμβρυο, χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα για την εκτίμηση της έκθεσης εμβρύων σε φυτοφάρμακα (Πίνακας 1.1). Επίσης, πρόσφατα έχει αναφερθεί η μέτρηση φυτοφαρμάκων ή μεταβολιτών τους σε ένα καθαρότερο υπόστρωμα, το σάλιο, (αντί του αίματος) για τη βιοπαρακολούθηση της πολύ πρόσφατης έκθεσης σε φυτοφάρμακα όπως στα οργανοφωσφορικά (Lu et al., 2003; Timchalk et al., 2004). Τα τελευταία χρόνια έχει επίσης μελετηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα το υπόστρωμα της τρίχας για την ανάλυση επιλεγμένων μεταβολιτών φυτοφαρμάκων και/ή των αρχικών ουσιών (Liu and Pleil, 2002; Tutudaki et al., 2003; Tutudaki and Tsatsakis, 2005; Ostrea et al., 2006; Posecion et al., 2006; Zhang et al., 2007; Schramm, 2008; Ostrea et al., 2008).

Η ανίχνευση των φυτοφαρμάκων στην τρίχα παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί προσφέρεται για την πιστοποίηση της χρόνιας έκθεσης, η οποία εκφράζεται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα, ίσως μη μετρήσιμα στο αίμα ή στα ούρα με τις συνήθεις εργαστηριακές μεθόδους. Οι τρίχες συγκρατούν τα φυτοφάρμακα που ενσωματώνονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα αφού δεν υπάρχει κάποιος δραστικός μεταβολισμός/απέκκριση για να τα απομακρύνει. Επιπλέον, η δειγματοληψία τριχών είναι εύκολη, μη επεμβατική, δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό και πολύ εξειδικευμένο προσωπικό. Σημαντικό επίσης πλεονέκτημα της εξέτασης των τριχών είναι ότι η τρίχα μπορεί να αποθηκευτεί και να μεταφερθεί χωρίς κάποιες ιδιαίτερες συνθήκες χάρις στη σταθερότητά της.

Έχει βρεθεί από μελέτες ότι τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, που θα μας απασχολήσουν στην παρούσα εργασία, ενσωματώνονται στην τρίχα και μπορούν να εξαχθούν από αυτό το πολύπλοκο υπόστρωμα κυρίως με στερεή-υγρή εκχύλιση, ακολουθούμενη μερικές φορές από εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης, και στη συνέχεια να αναλυθούν με την τεχνική GC-MS (Liu and Pleil, 2002; Tutudaki et al., 2003; Ostrea et al., 2006) (Πίνακας 1.1). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι όλες αυτές οι διαδικασίες μπορούν να μετρήσουν έναν περιορισμένο αριθμό οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων (το πολύ τέσσερα) και, συνεπώς, δεν επιτρέπουν την εκτίμηση της συνολικής έκθεσης του ανθρώπου στο πλήθος των ουσιών αυτών στις οποίες είναι εκτιθέμενος σε μια μόνο αναλύση.

Παράλληλα, υπάρχουν μελέτες (Ostrea et al., 2006; Posecion et al., 2006) (Πίνακας 1.1) στις οποίες έγιναν προσπάθειες να μετρηθούν επιλεγμένοι μεταβολίτες φυτοφαρμάκων, συμπεριλαμβανομένου και δύο χαρακτηριστικών μεταβολιτών οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων (malathion monocarboxylic acid (μεταβολίτης του malathion) και 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (μεταβολίτης του chlorpyrifos)), σε μητρικές τρίχες. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τους υπό μελέτη μεταβολίτες, μόνο ο χαρακτηριστικός μεταβολίτης του malathion, malathion monocarboxylic acid, ανιχνεύτηκε μόνο σε μια (Ostrea et al., 2006) από τις δύο αυτές πρόσφατες μελέτες. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι εντοπίζει την έκθεση σε κάποιο συγκεκριμένο φυτοφάρμακο. Ωστόσο, περιορίζεται στη μέτρηση μόνο δυο χαρακτηριστικών μεταβολιτών και, κατά συνέπεια, δεν προσφέρεται για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό του εύρους των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων στα οποία εκτίθενται οι άνθρωποι. Μέχρι τώρα, καμία μελέτη δεν έχει αναφέρει την ανίχνευση των DAPs στις τρίχες.

Πίνακας 1.1

Ανίχνευση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα

Μέθοδος	Ουσίες	Υπόστρωμα
Corrion et al., 2005	Οργανοφωσφορικά Χαρακτηριστικοί μεταβολίτες	αίμα
Lacassie et al., 2001	Οργανοφωσφορικά	ορός
Pitarch et al., 2003	Οργανοφωσφορικά	ορός
Ostrea et al., 2002	Οργανοφωσφορικά	μηκόνιο
Bielawski et al., 2005	Οργανοφωσφορικά Χαρακτηριστικοί μεταβολίτες	μηκόνιο
Richardson and Seiber, 1993	Οργανοφωσφορικά DAPs	ιστοί
Koch and Angerer, 2001	Χαρακτηριστικός μεταβολίτης	ούρα
Olsson et al., 2003	Χαρακτηριστικοί μεταβολίτες	ούρα
Bradman et al., 2003	Χαρακτηριστικοί μεταβολίτες DAPs	αμνιακό υγρό
Hernández et al., 2002	DAPs	ούρα
Bravo et al., 2004	DAPs	ούρα
Dulaurent et al., 2006	DAPs	ούρα
Ueyama et al., 2006	DAPs	ούρα
Drevenkar et al., 1994	DAPs	πλάσμα
Tarbah et al., 2004	DMP	γαστρικό υγρό αίμα, ούρα
Whyatt and Barr, 2001	DAPs	μηκόνιο
Hardt and Angerer, 2000	DAPs	ούρα
Oglobline et al., 2001	DAPs	ούρα
Bravo et al., 2002	DAPs	ούρα
Hernández et al., 2004	DAPs	ούρα
Ostrea et al., 2008	Χαρακτηριστικοί μεταβολίτες Οργανοφωσφορικά	μηκόνιο
Lu et al., 2003	Χαρακτηριστικοί μεταβολίτες Οργανοφωσφορικό	τρίχες σάλιο
Timchalk et al., 2004	Χαρακτηριστικός μεταβολίτης	σάλιο
Liu and Pleil, 2002	Οργανοφωσφορικά	τρίχες αίμα
Tutudaki et al., 2003	Οργανοφωσφορικό	τρίχες
Tutudaki and Tsatsakis, 2005	Οργανοφωσφορικό	τρίχες
Ostrea et al., 2006	Οργανοφωσφορικά Χαρακτηριστικοί μεταβολίτες	τρίχες
Posecion et al., 2006	Οργανοφωσφορικά Χαρακτηριστικοί μεταβολίτες	τρίχες

Ο μηχανισμός ενσωμάτωσης και συγκράτησης των DAPs στην τρίχα δεν έχει ακόμα διερευνηθεί. Τοξικές χημικές ουσίες μπορούν να ενσωματώνονται στο εσωτερικό της τρίχας μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (μεταφέρονται με την κυκλοφορία στα μαλλιά) ή με τη διάχυση μέσω του ιδρώτα του δέρματος ή του σμήγματος (Balíková and Habrdová, 2003). Επίσης, η λιποφιλικότητα και η βασικότητα μιας τοξικής χημικής ουσίας θεωρούνται βασικές προϋποθέσεις για την εναπόθεσή της στην τρίχα μέσω του αίματος, ενώ οι όξινοι μεταβολίτες φυτοφαρμάκων φαίνεται να εισχωρούν στην τρίχα σε μικρότερη έκταση (Pragst and Balikova, 2006). Μελέτες έδειξαν ότι τα DAPs απεκκρίνονται κυρίως στα ούρα, ενώ έχει επίσης αναφερθεί (Duggan et al., 2003) ότι η απέκκριση αυτών των μεταβολιτών μπορεί να γίνεται και από τον ιδρώτα. Η παρουσία αυτή των υδατοδιαλυτών DAPs στον ιδρώτα είναι πιθανό να συμβάλλει στην ενσωμάτωσή τους στην τρίχα δια της απορρόφησης του ιδρώτα εξωτερικά της τρίχας (μέσω του εξωτερικού λεπτού περιβλήματος της τρίχας (cuticle)) ή στην ενσωμάτωσή τους εντός της τρίχας από τον ιδρώτα.

Το πλεονέκτημα μιας τέτοιας μεθόδου ανάλυσης θα ήταν ότι ανιχνεύοντας σε μια μόνο ανάλυση τους κύριους μεταβολίτες ενός μεγάλου φάσματος οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων στην τρίχα, υπάρχει πολύ μεγαλύτερη δυνατότητα να ανιχνευτεί και να παρακολουθηθεί η χρόνια επαγγελματική (σε ανθρώπους που ασχολούνται στη χημική βιομηχανία ή σε αυτούς που ασχολούνται με την εφαρμογή των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων) και περιβαλλοντική (μέσω της διατροφής ή από παραμονή σε επιβαρημένο περιβάλλον) συνολική έκθεση στα φυτοφάρμακα αυτά παρά χρησιμοποιώντας μεθόδους που αναλύουν συγκεκριμένα φυτοφάρμακα ή χαρακτηριστικούς μεταβολίτες. Όμως, χωρίς να μπορεί να προσδιορισθεί ποιο συγκεκριμένο φυτοφάρμακο έχει προκαλέσει την έκθεση. Αλλά, είναι δυνατόν να βρεθεί η κατηγορία των οργανοφωσφορικών (dimethyl οργανοφωσφορικά (π.χ. malathion, methidathion) και diethyl οργανοφωσφορικά (π.χ. diazinon, chlorpyrifos)) που προκάλεσε την έκθεση από τα επίπεδα των dimethyl phosphate (DMP, DMTP, DMDTP) και diethyl phosphate (DEP, DETP, DEDTP) μεταβολιτών.

Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, διότι η συνολική εκτίμηση του επιπέδου της έκθεσης του ανθρώπου στα οργανοφωσφορικά, στηριζόμενη στις συγκεντρώσεις των DAPs στην τρίχα, θα μπορούσε να επιτρέψει μια συνολική εκτίμηση των βλαβερών επιπτώσεων των DAPs και των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων στην ανθρώπινη

υγεία, ιδίως για τις ευαίσθητες ομάδες όπως είναι τα βρέφη και τα παιδιά μικρής ηλικίας. Παράλληλα, θα μπορούσε να βοηθήσει στη μείωση της έκθεσης αφού βασικό στοιχείο για τη διαχείριση των κινδύνων εξαιτίας των φυτοφαρμάκων είναι να υπάρχουν οι κατάλληλες τεχνικές μέτρησης σε διάφορα βιολογικά ή μη δείγματα.

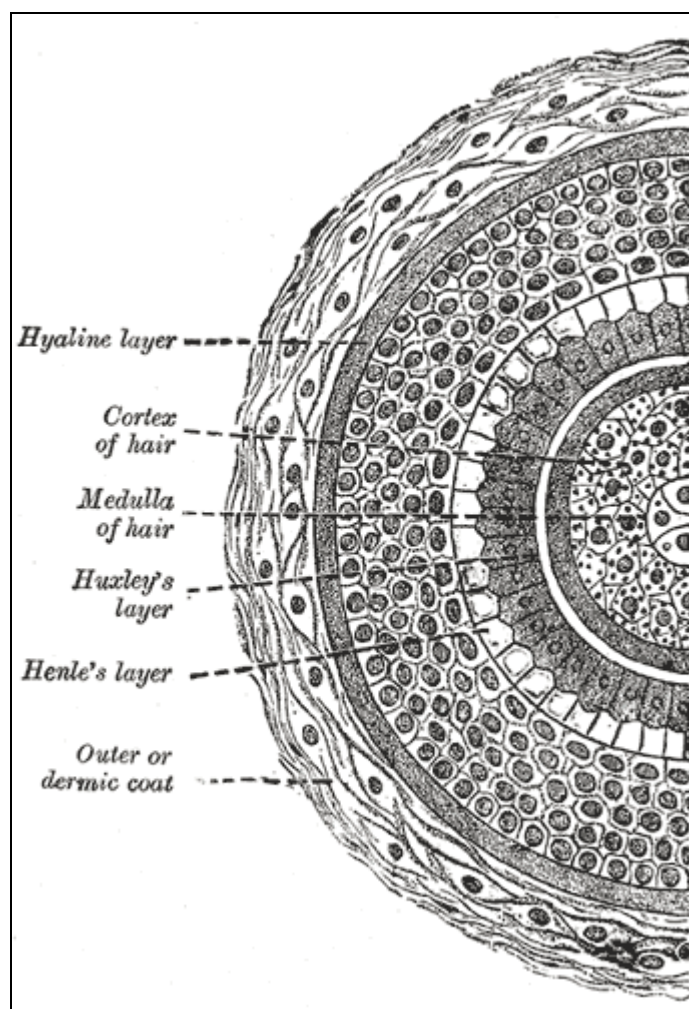
1.4.1.1. Η διαμόρφωση της τρίχας

Η τρίχα είναι ένας σύνθετος ιστός, που αποτελείται από τη ρίζα (follicle ή root) και το στέλεχος (shaft). Τα μαλλιά εκφύονται ανά ομάδες 1-4 τριχών που ονομάζονται τριχοθυλάκια. Η ρίζα εσωκλείεται στο τριχοθυλάκιο, καταδύεται στο δέρμα με κλίση και καταλήγει στο βολβό (bulb) (Kord, 2007).

Το στέλεχος είναι το ορατό τμήμα της τρίχας και αποτελείται από τρία στρώματα. Η επιδερμίδα (cuticle) είναι το εξωτερικό στρώμα της τρίχας, που αποτελείται από άχρωμα, επίπεδα κύτταρα σε κυματιστή διάταξη. Ο φλοιός (cortex) ενδιάμεσα, που περιέχει χρωστική (μελανίνη) και καθορίζει το χρώμα των μαλλιών, αποτελεί το κύριο σώμα του στελέχους της τρίχας. Επίσης, καθορίζει και τον κυματισμό της τρίχας (ίσια, σπαστή ή σγουρή). Ακόμη, περιέχει πυκνά πακεταρισμένη κερατίνη (keratin) και ευθύνεται για την ανάπτυξη του μεγαλύτερου τμήματος του στελέχους. Το μυελό (medulla) εσωτερικά που συνήθως υπάρχει στις μεγάλου διαμέτρου τρίχες και είναι πολύ μικρό σε διάμετρο (Εικόνα 1.4) (Robbins, 1988; Kord, 2007; Wikipedia, 2009).

Το στέλεχος της τρίχας αποτελείται κυρίως από κερατίνη, η οποία συμβάλλει σε μεγάλο ποσοστό και στο σχηματισμό των νυχιών και βρίσκεται και στην επιδερμίδα. Η κερατίνη χαρακτηρίζεται ως σύνολο πρωτεϊνών με κυρίαρχο χαρακτηριστικό την περιεκτικότητα σε θείο.

Ανάλογα με την υγρασία που περιέχει, η τρίχα αποτελείται από πρωτεΐνες (σε ποσοστό από 65% έως 95%), λιπίδια (1% έως 9%), ιχνοστοιχεία, πολυσακχαρίτες και νερό (Robbins, 1988). Οι πρωτεϊνικές αλυσίδες συγκρατούνται σφιχτά μεταξύ τους μέσω δισουλφιδικών δεσμών (-S-S-δεσμοί), δημιουργώντας μια αδιάλυτη και πολύ σταθερή κερατινοποιημένη δομή η οποία είναι ανθεκτική σε υδρόλυση ή ενζυμική δραστηριότητα (Steely et al., 2007). Κάθε τρίχα μεγαλώνει περίπου 0.035-0.4 cm την ημέρα ή περίπου 1 cm το μήνα (Montagna and Van Scott, 1958).



Εικόνα 1.4. Κάθετη τομή τρίχας (Wikipedia, 2009).

1.5. Σκοπός της παρούσας μελέτης

1.5.1. Η μελέτη σε πειραματόζωα

Οι πληροφορίες που συλλέγονται από μελέτες και πειραματικά δεδομένα σε διάφορα πειραματόζωα είναι ιδιαίτερες σημαντικές, διότι βοηθούν πολύ στην προσεχτική εξέταση κάποιων παραμέτρων και στην εξαγωγή ορθών συμπερασμάτων που στη συνέχεια θα αξιοποιηθούν στην εξήγηση των αποτελεσμάτων σε ανθρώπους. Η χρήση πειραματοζώων σε τοξικολογικά πειράματα σημαίνει ότι τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και να συγκριθούν εφόσον γίνεται αποδεκτό ότι η φυσιολογία τους παρομοιάζει του ανθρώπου. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι όση

ομοιότητα και αν διαθέτουν τα πειραματόζωα με τους ανθρώπους, μόνο η αντίστοιχη μελέτη σε ανθρώπους μπορεί να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα στο είδος μας.

Διάφορες μελέτες που διεξήχθησαν σε ζώα (Tsatsakis et al., 1998; Tutudaki et al., 2003; Tutudaki and Tsatsakis, 2005) έχουν αποδείξει την κατακράτηση των φυτοφαρμάκων, συμπεριλαμβανομένου και των οργανοφωσφορικών, στις τρίχες πειραματόζωων συστηματικά εκτιθέμενων σε αυτές τις ουσίες, γεγονός που υποδηλώνει την ικανότητα της τρίχας να εκτιμά τη χρόνια, χαμηλού επιπέδου έκθεση σε αυτά τα φυτοφάρμακα.

Μέρος της πειραματικής μας εργασίας περιλαμβάνει τη μελέτη των επιπέδων των μεταβολιτών του χορηγούμενου σε κουνέλια οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου dimethoate σε δείγματα τριχών που συλλέγονται από τα εκτιθέμενα κουνέλια. Θα χρησιμοποιηθούν ομάδες κουνελιών που λαμβάνουν διαφορετικές δόσεις του φαρμάκου και ομάδα ελέγχου. Σε αυτό το στάδιο θα μετρηθούν τα επίπεδα του κάθε μεταβολίτη (DMP, DMTP) του dimethoate στις τρίχες των πειραματόζωων αυτών. Επιπλέον, θα μελετηθεί κατά πόσο η συγκέντρωση μελανίνης στις τρίχες επηρεάζει την κατακράτηση των μεταβολιτών, θα προσδιορίσουμε τη σχέση της δόσης του φαρμάκου με τη συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη στις τρίχες και θα εξετάσουμε την επίδραση της χρονικής διάρκειας χορήγησης του φαρμάκου στα ανιχνευόμενα επίπεδα του κάθε μεταβολίτη. Σε αυτή τη φάση συλλέγονται όλες οι πρόσθετες πληροφορίες που χρειάζονται για να εκτιμηθεί κατά πόσο τα ανιχνευόμενα επίπεδα ουσιών σε αυτό το υπόστρωμα αντικατοπτρίζουν τη συνολική έκθεση του οργανισμού.

Επομένως, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διαπιστωθεί αν κουνέλια καθημερινά εκτιθέμενα δια του στόματος σε ένα οργανοφωσφορικό φυτοφάρμακο αποβάλλουν τους DAP μεταβολίτες του στις τρίχες τους, καθώς επίσης και να εξεταστεί αν υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ της δόσης του αρχικού αυτού φυτοφαρμάκου, του dimethoate, που χορηγείται και των επιπέδων των δύο κύριων μεταβολιτών του (DMP και DMTP) που ανιχνεύονται στην τρίχα των κουνελιών.

Κατά τη μελέτη αυτή θα αναλυθούν δείγματα τριχών από εκτιθέμενα στο dimethoate κουνέλια για την παρουσία δύο εκ των κυρίων προϊόντων διάσπασης αυτού και όχι για την αρχική ουσία, όπως είχε πραγματοποιηθεί σε πειραματικές μελέτες στο παρελθόν προκειμένου να εκτιμηθεί η παρατεταμένη, χαμηλού επιπέδου έκθεση των ζώων σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα (Tutudaki et al., 2003; Tutudaki and Tsatsakis, 2005). Οι υπό μελέτη ουσίες είναι μεταβολίτες επίσης και

πολλών άλλων οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων, όπως του fenitrothion, του fenthion, του malathion, του methidathion, του methyl parathion (Whyatt and Barr, 2001). Κατά συνέπεια, θετικά αποτελέσματα θα υποδήλωναν αυξημένη χρησιμότητα της μέτρησης των DAPs στην τρίχα ως ενός μη επεμβατικού δείκτη της έκθεσης στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.

Για αυτή την *in vivo* (σε ζωντανούς οργανισμούς) μελέτη, επιβάλλεται να αναπτυχθεί μια ευαίσθητη και αποτελεσματική μέθοδος που να μετρά τα επίπεδα των δύο μεταβολιτών του dimethoate στα δείγματα τριχών των κουνελιών. Πρέπει να διευκρινισθεί ότι έγινε αρχικά προσπάθεια να αναπτυχθεί μέθοδος για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών (DMP και DMTP) του dimethoate στις τρίχες των πειραματοζώων χρησιμοποιώντας το DEP ως εσωτερικό πρότυπο. Ωστόσο, όπως θα δούμε πιο κάτω, στην παρούσα μελέτη και το DEP θα χρησιμοποιηθεί τελικά ως μεταβολίτης-στόχος λόγω της ανίχνευσής του στα εξεταζόμενα δείγματα των πειραματοζώων.

Η επιλογή του φυτοφαρμάκου που εξετάζεται βασίστηκε στη συχνότητα χρήσης του σε καλλιέργειες της Ελλάδας (και όχι μόνο), σε ενδείξεις που υπήρχαν για την παρουσία του ως υπόλειμμα σε διάφορες τροφές (Mansour, 2004; Tsoutsi et al., 2006), καθώς και στη χρόνια τοξικότητά του (U.S. EPA, 2006).

1.5.2. Η μελέτη σε ανθρώπους

Το επόμενο στάδιο μετά την έρευνα και τα πειραματικά δεδομένα σε πειραματόζωα είναι η εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου σε ανθρώπινες τρίχες. Η συγκεκριμένη μελέτη θα πραγματοποιηθεί σε ανθρώπινα δείγματα τριχών και στοχεύει να διερευνήσει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου αλλά και να εξετάσει τα επίπεδα των DAP μεταβολιτών σε επαγγελματικά εκτιθέμενο πληθυσμό (χρήστες φυτοφαρμάκων).

Συγκεκριμένα, θα μετρηθούν τα επίπεδα του κάθε μεταβολίτη (DMP, DEP, DMTP) σε τρίχες κεφαλής από Έλληνες καλλιεργητές επαγγελματικά εκτιθέμενους σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα που ζούν σε δυο αγροτικές περιοχές της Ελλάδας. Στις συγκεκριμένες περιοχές χρησιμοποιείται ένα πλήθος οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων όπως chlorpyrifos, chlorpyrifos methyl, diazinon, dichlorvos, dicrotophos, dimethoate, fenthion, malathion, methidathion, methyl parathion, pirimiphos methyl.

Η αναλυτική μέθοδος που θα αναπτυχθεί κατά τη μελέτη σε πειραματόζωα και τα συμπεράσματα που σχετίζονται με τις παραμέτρους που επηρεάζουν την εναπόθεση στις τρίχες, θα χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της έκθεσης σε επαγγελματικά εκτιθέμενο πληθυσμό. Πρέπει να διευκρινισθεί ότι έγινε αρχικά προσπάθεια να αναπτυχθεί μέθοδος για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών (DMP και DMTP) του dimethoate στις τρίχες των πειραματοζώων χρησιμοποιώντας το DEP ως εσωτερικό πρότυπο (πράγμα που τελικά δεν θα είναι δυνατόν να γίνει, όπως θα δούμε πιο κάτω, λόγω της ανίχνευσης του DEP στα εξεταζόμενα δείγματα των πειραματοζώων). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη και το DEP θα χρησιμοποιηθεί ως μεταβολίτης-στόχος λόγω της πιθανότητας ανίχνευσής του στα εξεταζόμενα δείγματα των αγροτών.

1.6. Στοιχεία για το χορηγούμενο σε πειραματόζωα Dimethoate

Το dimethoate (*O,O*-dimethyl *S*-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate) (Πίνακας 1.2) είναι ένα από τα σημαντικότερα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα που χρησιμοποιείται ευρέως σε εδώδιμες και μη εδώδιμες καλλιέργειες σε όλο τον κόσμο ως ένα διασυστηματικό εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο επαφής και στομάχου (FAO, 2005). Τα σκευάσματά του (π.χ. Efdacon, Perfekthion, Rogor) εφαρμόζονται από το 1950 κυρίως στο σιτάρι, στο καλαμπόκι, στο βαμβάκι, στα όσπρια, σε διάφορα φρούτα και λαχανικά, όπως στις τομάτες, στο τριφύλλι, στα εσπεριδοειδή, στις πατάτες και στα πεπόνια για την αντιμετώπιση ενός ευρέως φάσματος ζιζανίων, όπως για παράδειγμα οι θρίπες, οι αφίδες, οι ακρίδες και τα ακάρεα (U.S. EPA, 2006). Στην Κρήτη χρησιμοποιείται εκτενώς για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς (*Bactocera* (*Dacus*) *Oleae*) (Tsoutsis et al., 2006), και στα εσπεριδοειδή για την εξόντωση ενός πλήθους εντόμων όπως του *Ceratitis capitata* και του *Rychitis bachus* (Pappas and Kyriakidis, 2003). Προϊόντα που περιέχουν dimethoate εφαρμόζονται επίσης και σε πολλά καλλωπιστικά φυτά. Το 2002, λόγω του αρκετά μεγάλου αριθμού των περιστατικών δηλητηριάσεων από dimethoate σε κατοικημένες περιοχές, όλες οι χρήσεις του σε κατοικημένους και δημόσιους χώρους απαγορεύτηκαν.

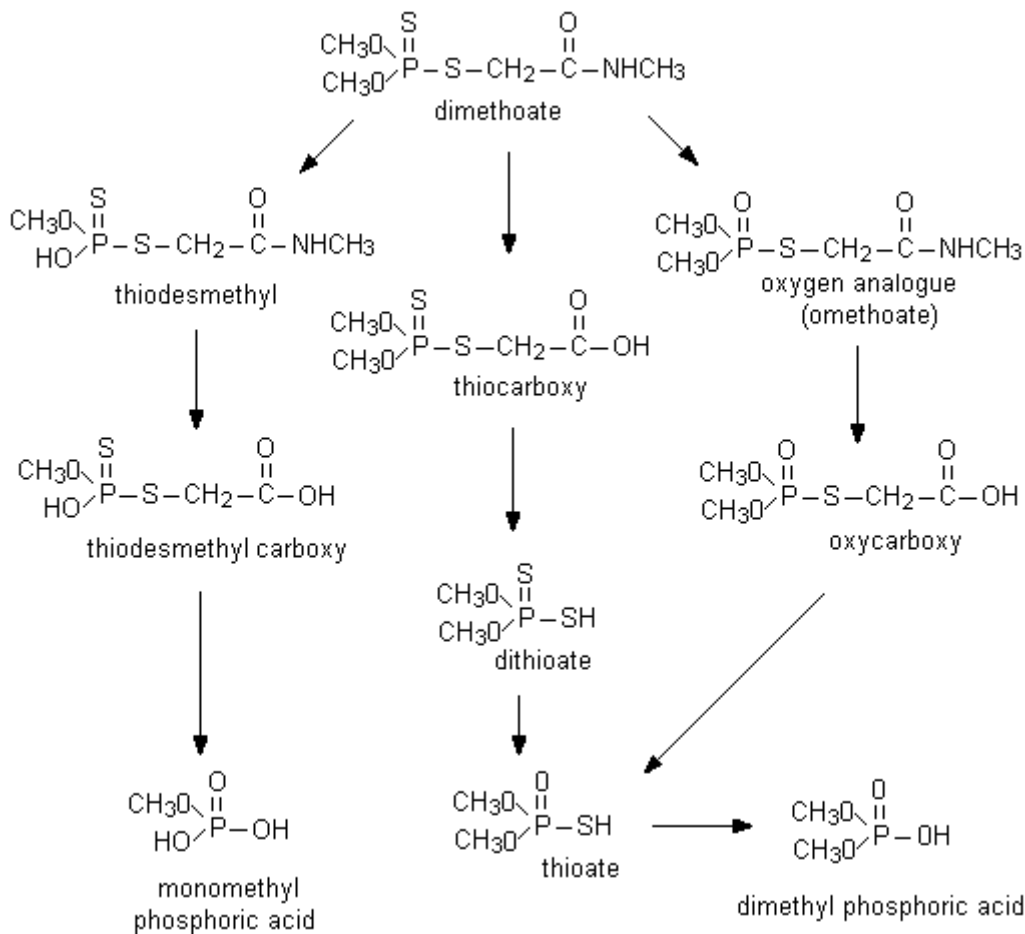
Η εκτεταμένη χρήση αυτού του φαρμάκου μπορεί να οδηγήσει σε δημόσια, παρατεταμένη ή επανειλημμένη, χαμηλού επιπέδου έκθεση στα κατάλοιπά του μέσω

του αέρα, συγκεκριμένων τροφίμων και του πόσιμου νερού. Όσον αφορά το πόσιμο νερό, η ουσία αυτή μπορεί να εισέρχεται στα επιφανειακά και τα υπόγεια ύδατα, επιμολύνοντας τις παροχές πόσιμου νερού (U.S. EPA, 2006). Όσοι εργάζονται με φυτοφάρμακα είναι πιθανό να είναι περισσότερο εκτιθέμενοι στο dimethoate από ότι ο γενικός πληθυσμός κατά τη διακίνηση, ανάμιξη, και/ή εφαρμογή του προϊόντος ή με την επιστροφή τους στη ψεκασμένη περιοχή. Επίσης, οι άνθρωποι που ζούν κοντά στις ψεκασμένες περιοχές είναι πολύ πιθανό να είναι σημαντικά εκτιθέμενοι στο εν λόγω φυτοφάρμακο.

Κατατάσσεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) ως ουσία «μετρίως τοξική» (moderately toxic, toxicity class II compound) (WHO, 2001), και έχει χρησιμοποιηθεί πολλές φορές σε περιστατικά αυτοδηλητηριάσεων (Eddleston et al., 2005). Ομοίως με άλλα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, η τοξική δράση αυτής της ουσίας στους ανθρώπους, όπως και στα έντομα, προκύπτει κυρίως από την αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης στο νευρικό σύστημα από το προϊόν βιοενεργοποίησης του dimethoate, το dimethoate oxon, που είναι αρκετά πιο τοξικό (ισχυρότερος αναστολέας) από το dimethoate και το οποίο χρησιμοποιείται επίσης ως εντομοκτόνο γνωστό ως omethoate (IPCS, 1992). Η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την κατάλυση της αποσύνθεσης της ακετυλοχολίνης, οδηγεί, όπως ήδη αναφέρθηκε, σε υπερδιέγερση των χολινεργικών συνάψεων (Ballantyne and Marrs, 1992) με ανεπιθύμητες επιπτώσεις πάνω στην υγεία του οργανισμού.

Τα κυριότερα γενικά κλινικά συμπτώματα που προκαλεί η έκθεση στο dimethoate (όπως ναυτία, κεφαλαλγία, ζάλη, τρέμουλο, έντονη σιελόρροια, εφίδρωση, ασθματική αναπνοή, κρίσεις) είναι περισσότερο εμφανή σε περιπτώσεις οξείας και σε υψηλά επίπεδα έκθεσης, όμως είναι δυνατόν να παρατηρηθούν και σε ανθρώπους με χρόνια και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης στο εντομοκτόνο (Exttoxnet, 1996). Υπάρχουν ενδείξεις από έρευνες που διεξήχθησαν σε ζώα, ότι το dimethoate προκαλεί προβλήματα στην αναπαραγωγή (Exttoxnet, 1996) και ανάπτυξη διαφόρων ζώων (IPCS, 1996). Επιπλέον, για την ουσία αυτή υπάρχουν ενδείξεις ότι προκαλεί τερατογένεση (U.S. Public Health Service, 1995) και μεταλλαξογένεση και έχει χαρακτηριστεί ως «πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο» (possible human carcinogen, group C carcinogen) (U.S. EPA, 2006).

Η ουσία αυτή μεταβολίζεται και αποβάλλεται αρκετά γρήγορα από τον οργανισμό των ανθρώπων και των ζώων και δεν συσσωρεύεται στους λιπώδεις ιστούς (IPCS, 1996) (λόγω του χαμηλού συντελεστή κατανομής της ένωσης αυτής μεταξύ οκτανόλης-νερού, $\log P=0.76$) (Benfenati et al., 2003). Μελέτες που διεξήχθησαν σε ανθρώπους και σε ζώα έδειξαν ότι το 76-90% ραδιοϊσοτόπου dimethoate εκκρίνεται στα ούρα μέσα σε 24 ώρες (IPCS, 1996). Η οξειδωτική του αποθείωση προς το omethoate και η υδρόλυση του οργανοφωσφορικού τμήματος προς τους dialkyl phosphate μεταβολίτες είναι οι κύριες μεταβολικές πορείες του dimethoate (Εικόνα 1.5). Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι οι μεταβολίτες του, DMP, DMTP και DMDTP, όπως όλα τα DAPs, είναι μη χαρακτηριστικοί μεταβολίτες οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων (σε αντίθεση με τους χαρακτηριστικούς μεταβολίτες) καθώς, όπως ήδη αναφέρθηκε, καθένας από αυτούς μπορεί να σχηματισθεί από το μεταβολισμό και πολλών άλλων φυτοφαρμάκων της κατηγορίας αυτής.



Εικόνα 1.5. Προτεινόμενες μεταβολικές πορείες του dimethoate σε ποντίκια (IPCS, 1996).

Πίνακας 1.2

Γενικές πληροφορίες για το dimethoate (IPCS, 1989; Exttoxnet, 1996)

Εντομοκτόνο	Dimethoate
Χημική Δομή	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{O}-\text{P}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{O} \end{array}$
Μοριακός Τύπος	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂
Μοριακό Βάρος	229.28
Σημείο Ζέσεως	107°C (0.05 mmHg)
Πίεση Αερίων Ατμών	1.1 mPa (25°C)
Διαλυτότητα στο Νερό	25 g L ⁻¹ (21°C)
Διαλυτότητα σε άλλους Διαλύτες	-Ελαφρώς διαλυτό σε αλειφατικούς υδρογονάνθρακες, αρωματικούς υδρογονάνθρακες, διαιθυλαιθέρα, τετραχλωράνθρακα, εξάνιο και ξυλόλιο. -Διαλυτό σε μεθανόλη και κυκλοεξάνιο. -Πολύ διαλυτό σε χλωροφόρμιο, βενζόλιο, τολουόλιο, αλκοόλες, εστέρες, κετόνες, μεθυλενοχλωρίδιο.
Μέση θανατηφόρα δόση (LD ₅₀ oral)* (κουνέλια) (mg kg ⁻¹ σ.β.)	300

* LD₅₀: η δόση στην οποία το 50% των εκτιθέντων πειραματοζώων πεθαίνει (Lethal Dose 50%).

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Αντιδραστήρια και υλικά

Το DMP (καθαρότητας, 98%), το DMTP (97%) καθώς και το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης pentafluorobenzyl bromide (PFBBBr) αγοράστηκαν από την Acros Organics (Geel, Belgium). Το DEP (99.3%) το προμηθευτήκαμε από την Chem Service (West Chester, USA). Το Dimethoate (99.2%) ήταν δωρεά της Ciba-Geigy Hellas S.A. (Anthoussa, Greece). Ο διαιθυλαιθέρας, το ακετονιτρίλιο, το *n*-εξάνιο και το τολουόλιο, που ήταν όλα HPLC-grade, το analytical-grade υδροχλωρικό οξύ (37%), καθώς και το άνυδρο θειϊκό νάτριο, το χλωριούχο νάτριο (NaCl), το δισουλφίδιο του νατρίου (Na₂S₂O₅) και το ανθρακικό κάλιο (K₂CO₃) αποκτήθηκαν από τη Merck (Darmstadt, Germany). Η μεθανόλη, που ήταν HPLC-grade, αγοράστηκε από τη Scharlau (Barcelona, Spain), η HPLC-grade ακετόνη και το HPLC-grade νερό από τη Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). Το Florisil (60-100 mesh) αγοράστηκε από τη Fluka (Buchs, Switzerland) και το Bondesil-Primary/Secondary Amine (PSA) 40 μm από τη Varian, Inc. (Palo Alto, CA, USA). Τα αέρια ήλιο (99.999% καθαρότητα) και άζωτο (99.99% καθαρότητα) ήταν από τη Messer Hellas (Athens, Greece).

Πυκνά διαλύματα προτύπων ουσιών παρασκευάζονταν για κάθε μεταβολίτη ξεχωριστά σε συγκέντρωση 1 mg mL⁻¹ σε μεθανόλη. Τα διαλύματα αυτά αποθηκεύονταν σε σφραγισμένα φιαλίδια προστατευμένα από το φως σε συνθήκες κατάψυξης (-20°C) το ανώτερο για ένα μήνα και αφήνονταν να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από κάθε χρήση. Από τα πυκνά αυτά διαλύματα των προτύπων ουσιών παρασκευαζόταν πυκνό διάλυμα με μίγμα και των τριών μεταβολιτών με προσθήκη κατάλληλου όγκου από το κάθε πυκνό διάλυμα μεταβολίτη και αραιώση με μεθανόλη. Με διαδοχικές αραιώσεις του μικτού αυτού διαλύματος με μεθανόλη παρασκευαζόταν μια σειρά από διαλύματα με μίγματα μεταβολιτών (διαλύματα εργασίας), σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0.05 μέχρι 100 ng mL⁻¹ για κάθε μεταβολίτη. Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονταν φρέσκα πριν από κάθε χρήση.

2.2. Ερευνητικό πρωτόκολλο μελέτης σε πειραματόζωα

Το πείραμα έγινε σε εννέα υγιή δίχρωμα (και με λευκές και με καφέ τρίχες) θηλυκά κουνέλια ακαθόριστης ράτσας, βάρους 3200-3500 g το καθένα. Τα κουνέλια χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες από τρία κουνέλια έκαστη και στεγάστηκαν σε ατομικά μεταλλικά κλουβιά σε ένα κλειστό δωμάτιο. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή (έτοιμη κουνελοτροφή) και νερό (φρέσκο νερό βρύσης). Τα κουνέλια εγκλιματίστηκαν σε αυτές τις συνθήκες για μια εβδομάδα (διάστημα προσαρμογής).

Μετά τον εγκλιματισμό τους, οι δυο από τις τρεις ομάδες των πειραματοζώων εκτέθηκαν σε υποτοξικές δόσεις του dimethoate για διάστημα έξι συνεχόμενων μηνών. Το φυτοφάρμακο χορηγούνταν από το στόμα διαλυμένο μέσα στο νερό (200 mL καθαρό νερό βρύσης), στη μια ομάδα πειραματοζώων στη δόση των 24 mg kg⁻¹ σ.β. ημερησίως, στη δεύτερη στη δόση των 12 mg kg⁻¹ σ.β. ημερησίως, ενώ στην τρίτη ομάδα (ομάδα ελέγχου, control), η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, δεν χορηγούνταν η υπό μελέτη ουσία. Οι επιλεγμένες δόσεις ήταν τουλάχιστον 10 φορές χαμηλότερες από την αναφερόμενη στη βιβλιογραφία μέση θανατηφόρα δόση (acute oral LD₅₀) (300 mg kg⁻¹ σ.β. στα κουνέλια) (IPCS, 1989) ώστε να αποφευχθούν έντονα συμπτώματα δηλητηρίασης. Τα κουνέλια ζυγίζονταν κάθε δυο μήνες και η κατανάλωση της τροφής τους παρατηρούνταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Επίσης, η κατάσταση όλων των κουνελιών ελεγχόταν και καταγραφόταν δυο φορές την ημέρα (νωρίς το πρωί, αργά το απόγευμα) ή και πιο συχνά. Όποτε τα ζώα εμφάνιζαν το παραμικρό ανησυχητικό σύμπτωμα δηλητηρίασης, η χορήγηση του φαρμάκου διακοπτόταν αμέσως για δυο ημέρες.

Πρίν από την έναρξη χορήγησης του φαρμάκου, οι τρίχες από την πλάτη των κουνελιών ξυρίστηκαν με μια ηλεκτρική ξυριστική μηχανή για ζώα και μια ποσότητα τριχών από κάθε χρώμα (λευκά και καφέ δείγματα τριχών) συλλέχθηκε από το καθένα κουνέλι. Η δειγματοληψία τριχών ξεκίνησε περίπου τέσσερις μήνες μετά τη χορήγηση της πρώτης δόσης της ουσίας. Πιο συγκεκριμένα, τρίχες και των δυο χρωμάτων συλλέχθησαν τέσσερις και έξι μήνες μετά την έναρξη της έκθεσης από την πλάτη κάθε εκτιθέμενου και μη εκτιθέμενου κουνελιού, απ' όπου δεν μπορεί να υπάρξει εξωτερική επιμόλυνση, και το κάθε δείγμα αναλύθηκε χωριστά για τα υπολείμματα των μεταβολιτών DMP και DMTP. Τα δείγματα αυτά συλλέγονταν σε χάρτινους φακέλους

και αποθηκεύονταν σε συνθήκες δωματίου και σε ξηρή ατμόσφαιρα μέχρι να αναλυθούν. Η παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από την Κτηνιατρική Υπηρεσία Ηρακλείου, το Υπουργείο Γεωργίας και συμμορφώθηκε στις εθνικές οδηγίες και στις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την προστασία και μεταχείριση πειραματοζώων.

2.3. Συλλογή δειγμάτων από ανθρώπους

Τριάντα δείγματα τριχών κεφαλής συλλέχθηκαν από καλλιεργητές (γυναίκες) επαγγελματικά εκτιθέμενους σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα που εργάζονται σε ανοιχτές καλλιέργειες και κατοικούν σε δυο αγροτικές περιοχές της Ελλάδας, την Αμαλιάδα και τη Μεσσαρά. Τα δείγματα τριχών (περίπου 500 mg ή από 500 τρίχες το καθένα), μήκους 4.0-6.0 cm, κόπηκαν από το σβέρκο, όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο δέρμα του κεφαλιού, και φυλάχθηκαν σε χάρτινους φακέλους σε συνθήκες δωματίου και σε ξηρή ατμόσφαιρα μέχρι να αναλυθούν. Τα δείγματα αυτά ήταν διαφόρων χρωμάτων (μαύρα, ξανθά, καστανά, ψαρά, κόκκινα), και μερικά ήταν βαμμένα ή ξανθά από οξυζενέ (οξυζεναρισμένα). Ανθρώπινες τρίχες κεφαλής (περίπου 15-20 gr συνολικά) που συλλέχθηκαν από μωρά των οποίων οι γονείς ανήκουν στον αστικό πληθυσμό χρησιμοποιήθηκαν, όπως θα δούμε παρακάτω, ως τυφλά δείγματα (μάρτυρες) για τον ποιοτικό έλεγχο της μελέτης σε ανθρώπους. Τα δείγματα τριχών από μωρά αποκτήθηκαν από το Νοσοκομείο καθώς και από μωρά συγγενών και φίλων. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από γιατρούς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου και όλα τα εξεταζόμενα άτομα έδωσαν την έγγραφη συγκατάθεσή τους.

2.4. Αναλυτικά όργανα

2.4.1. Αέρια χρωματογραφία

Για τον προσδιορισμό των υπό μελέτη ουσιών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Shimadzu GCMS-QP2010, που ήταν εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη (AOC-5000, Shimadzu, Kyoto, Japan), στον οποίο ο όγκος εισαγωγής

του δείγματος είχε επιλεγεί στο 1 μL . Η θερμοκρασία στο τμήμα εισαγωγής του δείγματος (τμήμα ενέσεως, injector) επιλέχθηκε στους 250°C και η εισαγωγή των δειγμάτων γινόταν με την τεχνική splitless. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με γραμμική ταχύτητα 36.7 cm sec^{-1} . Η ανάλυση των συστατικών του δείγματος έγινε σε Equity®-5 στήλη τριχοειδούς σωλήνα (poly(5% diphenyl/95% dimethylsiloxane), 30 m x 0.20 mm i.d. x 0.20 μm) από τη Supelco Company (Bellefonte, PA, USA). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της ανάλυσης ξεκινούσε από τους 70°C , όπου και παρέμενε για 1 min. Στη συνέχεια, αυξανόταν στους 220°C με $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ και τέλος αυξανόταν στους 280°C με $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$, όπου και παρέμενε για 5 min. Η διάρκεια του προγράμματος χρωματογραφικής ανάλυσης ήταν 40 min για κάθε δείγμα.

2.4.2. Φασματομετρία μάζας

Η βαθμονόμηση του ανιχνευτή μάζας πραγματοποιούνταν κάθε μέρα πριν από την έναρξη ανάλυσης μιας σειράς δειγμάτων χρησιμοποιώντας το υλικό αναφοράς perfluorotributylamine (PFTBA). Το φασματόμετρο μάζας χρησιμοποιούσε τετραπολικό αναλυτή μαζών και εφάρμοζε την τεχνική του ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI). Η ενέργεια των ηλεκτρονίων ήταν 70 eV και το ρεύμα εκπομπής 60 μA . Η θερμοκρασία στην πηγή ιονισμού (ion source) είχε επιλεγεί στους 250°C και στη γραμμή μεταφοράς (interface) στους 300°C . Χρωματογραφήματα με τη μέθοδο πλήρους σάρωσης (Full Scan) λαμβάνονταν σαρώνοντας στην περιοχή μαζών m/z μεταξύ 40 και 600 με ένα χρόνο σάρωσης (scan time) 0.5 s.

Η ποσοτική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM) με ένα χρόνο σάρωσης 0.2 s, χρησιμοποιώντας το πιο έντονο ή χαρακτηριστικό ιόν για τον ποσοτικό προσδιορισμό και όπου ήταν δυνατόν δύο δευτερεύοντα ιόντα για την επιβεβαίωση κάθε μιας από τις υπό μελέτη ουσίες.

Το πρόγραμμα χρωματογραφικής ανάλυσης χωρίστηκε σε τρία διαδοχικά, ξεχωριστά μεταξύ τους τμήματα (segments). Το πρώτο τμήμα κάλυπτε το χρονικό διάστημα από 14.20 μέχρι 17.25 min, το δεύτερο από 17.26 μέχρι 19.25 min και το τρίτο από 19.26 μέχρι 25.00 min.

2.5. Προετοιμασία του δείγματος

Ξέπλυμα της τρίχας. Δείγμα τριχών των 100 mg ξεπλύθηκε διαδοχικά με 5 mL νερού και 5 mL μεθανόλης για την απομάκρυνση τυχόν εξωτερικής επιμόλυνσης, στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου και κόπηκε σε τμήματα του 1 cm. 50 mg του δείγματος μεταφέρθηκαν σε ένα γυάλινο φιαλίδιο με βιδωτό πώμα.

Στερεή-υγρή εκχύλιση. Στο παραπάνω φιαλίδιο προστέθηκαν 5 mL νερού και το δείγμα εκχυλίστηκε για 1 h σε υδατόλουτρο με υπερήχους και κατόπιν υποβλήθηκε σε οριζόντια ανακίνηση με ένα shaker για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου.

Απομόνωση μεταβολιτών, παραγωγοποίηση, καθαρισμός. Μετά τη στερεή-υγρή εκχύλιση, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 2600g επί 15 min και το υδατικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό γυάλινο φιαλίδιο των 15 mL με βιδωτό πώμα. Ακολούθησε επεξεργασία σύμφωνα με μια παλαιότερη μέθοδο που αναπτύχθηκε για την ανάλυση των DAPs στα ούρα (Ueyama et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, στο φιαλίδιο με το υδατικό εκχύλισμα προστέθηκαν διαδοχικά 5 g NaCl, 1 mL HCl (6 mol L⁻¹), 50 mg Na₂S₂O₅ και 5 mL διαιθυλαιθέρα:ακετονιτριλίου (1:1, v/v). Το μίγμα ανακινήθηκε μηχανικά για 5 min και φυγοκεντρήθηκε (2000g για 5 min στους 4°C). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε ένα άλλο βιδωτό γυάλινο φιαλίδιο το οποίο περιείχε 15 mg K₂CO₃. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε με 5 mL διαιθυλαιθέρα:ακετονιτριλίου (1:1, v/v). Τα δύο εκχυλίσματα συνενώθηκαν και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού στους 45°C σε ήπιο ρεύμα αζώτου.

Στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκαν 15 mg K₂CO₃, 1 mL ακετονιτριλίου και 50 μL PFBBt. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα vortex και επώαση υπό ελαφρά ανακίνηση σε υδατόλουτρο στους 80°C για 30 min ακριβώς. Μετά την παραγωγοποίηση, προστέθηκαν 4.5 mL νερού και 4.5 mL *n*-εξανίου, και το περιεχόμενο ανακινήθηκε ζωηρά για 5 min και στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε για 5 min σε 2000g. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε με 4.5 mL *n*-εξανίου.

Έπειτα, τα δύο εκχυλίσματα συνενώθηκαν και καθαρίστηκαν με πέρασμα από στήλη εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) που περιείχε από τον πάτο προς την κορυφή 0.3 g Florisil, 0.1 g Bondesil-PSA και 0.5 g άνυδροθειϊκό νάτριο (το

πληρωτικό υλικό πακετάρεται σε πιπέττα Pasteur). Στη συνέχεια, η στήλη πλύθηκε με 5 mL ακετόνη:n-εξάνιο (2:98, v/v) για να απομακρυνθεί η περίσσεια PFBBg (Ueyama et al., 2006) και εκλούστηκε με 5 mL ακετόνη:n-εξάνιο (15:85, v/v). Τέλος, το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού στους 45°C σε ήπιο ρεύμα αζώτου, επαναδιαλύθηκε σε 200 μL τολουολίου και εισήχθηκε στο σύστημα GC-MS που περιγράφηκε παραπάνω (Ενότητα 2.4).

2.6. Δείγματα ποιοτικού ελέγχου

2.6.1. Μελέτη σε πειραματόζωα

Τρίχες κουνελιών απαλλαγμένες από τους εξεταζόμενους μεταβολίτες του dimethoate (DMP, DMTP), που συλλέχθηκαν από τα μη εκτιθέμενα κουνέλια (κουνέλια ελέγχου) κατά τη διάρκεια της χορήγησης του φαρμάκου όπως επίσης και από όλα τα υπό μελέτη κουνέλια πριν από την έναρξη της χορήγησης, χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλά δείγματα (μάρτυρες) για τον ποιοτικό έλεγχο της μελέτης που πραγματοποιήθηκε στα πειραματόζωα. Επειδή, όπως θα δούμε πιο κάτω, το DEP ανιχνεύτηκε επίσης στα εξεταζόμενα δείγματα των πειραματοζώων, για τις αναλύσεις του, τρίχες κουνελιών απαλλαγμένες από τα υπολείμματά του λήφθηκαν πριν από την έναρξη του πειραματισμού (δείγματα που συλλέχθηκαν πριν από τη χορήγηση της πρώτης δόσης) από πέντε από τα εννέα κουνέλια που εξετάστηκαν. Πριν από τα πειράματα φόρτισης, τα τυφλά δείγματα τριχών αναλύονταν με την προτεινόμενη μέθοδο που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.5, προκειμένου να διαπιστωθεί ότι ήταν απαλλαγμένα από τις ουσίες που μας ενδιαφέρουν.

2.6.2. Μελέτη σε ανθρώπους

Ανθρώπινες τρίχες κεφαλής απαλλαγμένες από τους υπό εξέταση μεταβολίτες (DMP, DEP, DMTP) που συλλέχθηκαν από μωρά χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλά δείγματα (μάρτυρες) για τον ποιοτικό έλεγχο της μελέτης σε ανθρώπους. Όπως και στις τρίχες κουνελιών (Ενότητα 2.6.1), πριν από τα πειράματα φόρτισης, τα δείγματα τριχών από μωρά αναλύονταν με την προτεινόμενη μέθοδο που

περιγράφηκε στην Ενότητα 2.5, για να διαπιστωθεί ότι ήταν απαλλαγμένα από τις ουσίες που μας ενδιαφέρουν.

2.7. Ποσοτικός προσδιορισμός

Για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς των δειγμάτων κατασκευάζονταν καμπύλες αναφοράς πέντε σημείων μεταξύ των συγκεντρώσεων 0.1 και 5 ng mg⁻¹, τόσο στη μελέτη στα πειραματόζωα όσο και στους ανθρώπους, αναλύοντας τυφλά δείγματα τριχών φορτισμένα (εμβολιασμένα) με τους εξεταζόμενους μεταβολίτες. Τα φορτισμένα αυτά δείγματα παρασκευάζονταν με προσθήκη κατάλληλου όγκου από τα μεθανολικά διαλύματα με μίγματα μεταβολιτών (διαλύματα εργασίας) σε 50 mg τριχών, απαλλαγμένα από τις υπό εξέταση ουσίες, πριν από τη στερεή-υγρή εκχύλιση. Τα φορτισμένα δείγματα ανακινούνταν καλά και αφήνονταν σε ηρεμία επί μια ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για εξισορρόπηση. Ακολουθούσε η στερεή-υγρή εκχύλιση και η διαδικασία συνεχιζόταν όπως ακριβώς περιγράφεται παραπάνω (Ενότητα 2.5). Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης τρία διαφορετικά δείγματα εκχυλίζονταν και αναλύονταν.

2.8. Έλεγχος της αξιοπιστίας της μεθόδου

2.8.1. Μελέτη σε πειραματόζωα

Ο έλεγχος της αξιοπιστίας (validation) της προτεινόμενης αναλυτικής μεθόδου για την ανάλυση των εξεταζόμενων μεταβολιτών στις τρίχες κουνελιών έγινε χρησιμοποιώντας δείγματα τριχών από κουνέλια απαλλαγμένα από τις ουσίες αυτές.

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) μιας ουσίας είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία το ιόν ποσοτικού προσδιορισμού της ένωσης αυτής μπορεί να ανιχνευτεί με λόγο σήματος προς θόρυβο (Signal to Noise ratio, S/N) S/N=3 και υπολογίστηκε από το χρωματογράφημα του φορτισμένου δείγματος στο κατώτερο επίπεδο συγκέντρωσης (0.1 ng mg⁻¹) της καμπύλης αναφοράς. Το υπολογιζόμενο όριο ανίχνευσης επαληθευόταν (στην περίπτωση που ήταν μικρότερο

από το κατώτερο επίπεδο συγκέντρωσης της καμπύλης αναφοράς) αναλύοντας δείγματα φορτισμένα στο επίπεδο συγκέντρωσης του LOD. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantification, LOQ) ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία το ιόν ποσοτικού προσδιορισμού της ένωσης μπορεί να ανιχνευτεί με λόγο σήματος προς θόρυβο S/N=10.

Η ανάκτηση κατά την εκχύλιση (extraction recovery) προσδιορίστηκε φορτίζοντας με τους μεταβολίτες που μας ενδιαφέρουν πλυμένα και κομμένα τυφλά δείγματα τριχών (50 mg) πριν από τη στερεή-υγρή εκχύλιση στις συγκεντρώσεις 0.5 και 5 ng mg⁻¹ εις τριπλούν, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως τα δείγματα που χρησιμοποιούνταν για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς (Ενότητα 2.7), και αναλύοντάς τα σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο (Ενότητα 2.5). Έξι επιπρόσθετα τυφλά δείγματα τριχών (μη φορτισμένα) αναλύονταν παράλληλα. Τα τελευταία αυτά δείγματα που δεν εμβολιάστηκαν πριν την προετοιμασία, φορτίστηκαν εις τριπλούν στα επίπεδα συγκέντρωσης 0.5 και 5 ng mg⁻¹ στο στάδιο παραγωγοποίησης. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνταν ως δείγματα ελέγχου και αντιπροσώπευαν την 100% ανάκτηση. Η επεξεργασία όλων των δειγμάτων μετά την παραγωγοποίηση συνεχίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο. Η ανάκτηση υπολογίστηκε ως ο λόγος της επιφάνειας της κορυφής της ένωσης στα δείγματα ανάκτησης προς αυτήν στα δείγματα ελέγχου.

Για τον υπολογισμό της επαναληπτικότητας όλης της αναλυτικής μεθόδου εντός μιας ημέρας, αναλύονταν καθημερινά τρία δείγματα ανάκτησης στο επίπεδο 0.5 ng mg⁻¹. Επιπλέον, η μεταξύ των ημερών επαναληπτικότητα της μεθόδου υπολογίστηκε αναλύοντας εις τριπλούν δείγματα ανάκτησης στο επίπεδο 0.5 ng mg⁻¹ για τρεις διαφορετικές ημέρες.

2.8.2. Μελέτη σε ανθρώπους

Δείγματα τριχών κεφαλής απαλλαγμένα από τους υπό μελέτη μεταβολίτες που συλλέχθησαν από μωρά χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ελεγχθεί η αξιοπιστία της αναλυτικής μεθόδου για την ανάλυση των ουσιών αυτών σε ανθρώπινα δείγματα τριχών.

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού υπολογίστηκαν όπως περιγράφεται στη μελέτη σε πειραματόζωα (Ενότητα 2.8.1).

Για τη μελέτη σε ανθρώπους, η ανάκτηση κατά την εκχύλιση υπολογίστηκε στις συγκεντρώσεις 1 και 10 ng mg⁻¹ ενώ η επαναληπτικότητα όλης της μεθόδου στο επίπεδο 1 ng mg⁻¹ με τον ίδιο τρόπο όπως στη μελέτη σε πειραματόζωα (Ενότητα 2.8.1).

Για τον υπολογισμό της επαναληπτικότητας του οργάνου εντός μιας ημέρας, εισήχθη στο σύστημα GC-MS που περιγράψαμε παραπάνω (Ενότητα 2.4) το ίδιο τελικό εκχύλισμα σε τολουόλιο του δείγματος ανάκτησης (1 ng mg⁻¹) πέντε φορές στη διάρκεια μιας ημέρας. Επιπλέον, η μεταξύ των ημερών επαναληπτικότητα του οργάνου υπολογίστηκε εισάγοντας στο σύστημα GC-MS το ίδιο δείγμα (1 ng mg⁻¹) κάθε μέρα για τέσσερεις συνεχόμενες ημέρες.

Τέλος, για να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, 30 δείγματα τριχών από αγρότες αναλύθηκαν (εις τριπλούν) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των DMP, DEP και DMTP.

2.9. Στατιστική ανάλυση

Τα επίπεδα των μεταβολιτών σε κάθε ομάδα (ομάδα με βάση το χρώμα της τρίχας, ομάδα με βάση το επίπεδο της δόσης, ομάδα με βάση τη διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου) εκφράστηκαν ως μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση. Οι διαφορές στα επίπεδα των μεταβολιτών μεταξύ των ομάδων ελέγχθηκαν με τη δοκιμή t (t-test) ή με τη δοκιμή ANOVA. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το SPSS 17.0 (Στατιστικό Πακέτο για τις Κοινωνικές Επιστήμες, SPSS Inc). Καθορίζεται σαν επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Βελτιστοποίηση της μεθόδου

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τριών DAP μεταβολιτών που μας ενδιαφέρουν στην τρίχα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων ουσιών τα οποία είναι εγκλωβισμένα στην τρίχα είναι ένα δύσκολο έργο λόγω της πολυπλοκότητας του υποστρώματος. Στην περίπτωση μας, το βασικό πρόβλημα που έπρεπε να αντιμετωπισθεί ήταν η εξαγωγή των μεταβολιτών από την τρίχα, η σχέση μεταξύ του διαλύτη, των εξεταζομένων ουσιών και του αναλυόμενου υποστρώματος.

Οι υπό μελέτη ενώσεις είναι πολύ υδατοδιαλυτές και, συνεπώς, δύσκολο να εξαχθούν ποσοτικά από την τρίχα με τους συνήθεις οργανικούς διαλύτες. Επιπλέον, η όξινη και η αλκαλική υδρόλυση δεν θα μπορούσαν να εφαρμοστούν για την εξαγωγή ουσιών όπως τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα και οι DAP μεταβολίτες από την τρίχα, διότι οι ενώσεις αυτές είναι ασταθείς σε τόσο ισχυρές χημικές συνθήκες. Έτσι, για τη μελέτη μας, αναπτύχθηκε μια κατάλληλη διαδικασία προεπεξεργασίας που στηρίζεται στην τεχνική της στερεής-υγρής εκχύλισης (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.5) χρησιμοποιώντας νερό (5 mL) ως διαλύτη εκχύλισης. Με τη διαδικασία αυτή εκχυλίζονται αποτελεσματικά οι ουσίες χωρίς να καταστρέφονται, απλοποιώντας με αυτό τον τρόπο τη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης της τρίχας (εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες, όξινη ή βασική υδρόλυση, ενζυματική χώνευση) (Nakahara, 1999).

Το δείγμα υποβάλλεται αρχικά σε εκχύλιση με υπερήχους επί 1 h για να δημιουργηθεί καλύτερη επαφή μεταξύ του διαλύτη και του στερεού υποστρώματος και να διευκολυνθεί η εξαγωγή των ουσιών μας από τη μήτρα του δείγματος και κατόπιν ακολουθεί οριζόντια ανακίνηση με ένα shaker. Αφού δοκιμάστηκαν διάφοροι χρόνοι (4, 6 και 12 h), ο χρόνος της εκχύλισης (μετά τους υπερήχους) επιλέχθηκε στις 12 h με βάση τα αποτελέσματα των ανακινήσεων.

Μετά το στάδιο προεπεξεργασίας, ακολουθήθηκε η πορεία που χρησιμοποίησε ο Ueyama et al. (2006) για τον προσδιορισμό των DAPs στα ούρα με ελάχιστες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, για την απομόνωση των ουσιών μας από το

νερό εφαρμόστηκε η τεχνική της εκχύλισης υγρής-υγρής φάσης με μίγμα διαιθυλαιθέρα-ακετονιτριλίου. Το χρησιμοποιούμενο μίγμα διαλυτών αποδείχθηκε αποτελεσματικό καθώς το μεγαλύτερο μέρος των μεταβολιτών μετακινείται από την υδατική στιβάδα στη στιβάδα του διαιθυλαιθέρα.

Η παραγωγοποίηση των DAPs με PFBBr, κάτω από αυστηρές συνθήκες αντίδρασης (θερμοκρασία αντίδρασης 80°C, χρόνος παραγωγοποίησης 30 min), δίνει ικανοποιητικά και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα και για τα πρότυπα διαλύματα και για τα φορτισμένα δείγματα τριχών. Ο καθαρισμός είναι ένα πολύ βασικό στάδιο στην αναλυτική διαδικασία γιατί σημαντικές ποσότητες PFBBr μπορεί να προκαλέσουν ζημιά στη στήλη και στον ανιχνευτή (Ueyama et al., 2006). Επίσης, κατά τον καθαρισμό απομακρύνονται τα λιπίδια καθώς και άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες που προέρχονται από τη μήτρα του δείγματος.

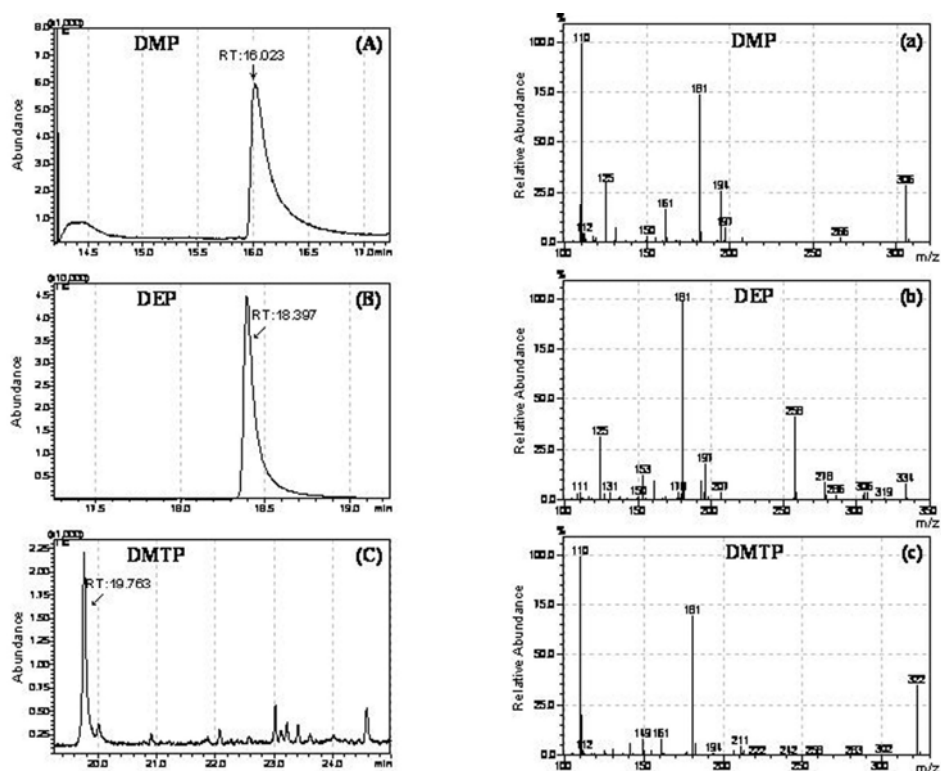
3.2. Μελέτη σε πειραματόζωα

3.2.1. Αποτελέσματα αξιολόγησης της μεθόδου

Από τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης των παραγωγοποιημένων προτύπων διαλυμάτων καθενός μεταβολίτη χωριστά, επιλέχθηκαν τα ακόλουθα θραύσματα ιόντα (m/z) για τις αναλύσεις με τη μέθοδο SIM (τα ιόντα ποσοτικού προσδιορισμού είναι υπογραμμισμένα): DMP (110 / 194 / 306), DEP (197 / 258 / 334) και DMTP (211 / 322) (Εικόνα 3.1), τα οποία συμφωνούν με τα αναφερθέντα στη βιβλιογραφία (Ueyama et al., 2006). Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται επίσης τυπικά χρωματογραφήματα των παραγωγοποιημένων προτύπων ουσιών για κάθε μεταβολίτη χωριστά.

Η γραμμικότητα εξετάστηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τρίχες κουνελιών και οι καμπύλες αναφοράς (Παράρτημα A.1) εμφάνισαν καλή γραμμικότητα στην υπό εξέταση περιοχή συγκέντρωσης από 0.1 μέχρι 5 ng mg⁻¹, με συντελεστές γραμμικής συσχέτισης (R^2) μεταξύ 0.9960 και 0.9998 για τις ουσίες που μελετήθηκαν (Πίνακας 3.1). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1 τα όρια ανίχνευσης για τα DMP, DEP και DMTP ήταν 0.07, 0.01 και 0.08 ng mg⁻¹, αντίστοιχα. Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού ήταν 0.22 ng mg⁻¹ για το DMP, 0.04 ng mg⁻¹ για το DEP και 0.25 ng mg⁻¹ για το DMTP. Καλές τιμές ανακτήσεων προέκυψαν (αναλύοντας

δείγματα ανάκτησης σε τρίχες κουνελιών) που κυμαίνονταν μεταξύ 58.8 και 101.4% (Πίνακας 3.1). Αν και δεν έχει ακόμα μελετηθεί εκτεταμένα, υποθέτουμε ότι η σχετικά χαμηλή ανάκτηση του DMP σε σχέση με αυτή των άλλων ουσιών οφείλεται στη μεγαλύτερη πολικότητα και στη μεγαλύτερη έλξη που έχει η ένωση αυτή για την υδατική φάση. Η επαναληπτικότητα όλης της αναλυτικής μεθόδου εντός μιας ημέρας κυμαινόταν μεταξύ 10.9 και 15.3% για το επίπεδο φόρτισης 0.5 ng mg^{-1} , ενώ η μεταξύ των ημερών επαναληπτικότητα της μεθόδου κυμαίνονταν από 11.0 μέχρι 16.4% (Πίνακας 3.1).



Εικόνα 3.1. GC-MS χρωματογραφήματα του συνόλου των ιόντων (Total Ion Chromatograms, TICs) με τη μέθοδο της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM) (A, B, C) και φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης (Full Scan) (a, b, c) από την ανάλυση παραγωγοποιημένων προτύπων διαλυμάτων (1500 ng σε μεθανόλη): dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), dimethyl thiophosphate (DMTP).

Πίνακας 3.1

Συντελεστές γραμμικής συσχέτισης, όρια ανίχνευσης (LODs), όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOQs), ανακτήσεις εκχύλισης και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSDs) για την ανάλυση των υπό μελέτη dialkyl phosphates (dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), dimethyl thiophosphate (DMTP)) σε τρίχες κουνελιών

Μεταβολίτης	Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης	Όριο ανίχνευσης (ng mg ⁻¹)	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (ng mg ⁻¹)	Ανάκτηση (%)		Επαναληπτικότητα μεθόδου, RSD (%)*	
				0.5 ng mg ⁻¹	5 ng mg ⁻¹	Εντός ημέρας (n=3)	Μεταξύ ημερών (n=3)
DMP	0.9960	0.07	0.22	58.8	68.8	11.3	12.5
DEP	0.9998	0.01	0.04	65.3	97.2	10.9	11.0
DMTP	0.9983	0.08	0.25	98.4	101.4	15.3	16.4

* Τα δεδομένα προέρχονται από φορτισμένα δείγματα τριχών στο επίπεδο συγκέντρωσης 0.5 ng mg⁻¹.

3.2.2. Αποτελέσματα αναλύσεων των DAPs σε δείγματα τριχών πειραματοζώων εκτιθέμενων στο dimethoate

Δεκαοχτώ δείγματα τριχών που συλλέχθηκαν από όλα τα εξεταζόμενα κουνέλια πριν από την έναρξη της χορήγησης και τριάντα έξι δείγματα τριχών που συλλέχθηκαν από τα εκτιθέμενα και μη εκτιθέμενα στο dimethoate κουνέλια στη διάρκεια της χορήγησης του φαρμάκου αναλύθηκαν (εις τριπλούν) με τη μέθοδο που περιγράψαμε, με σκοπό να ανιχνευτούν και να προσδιορισθούν ποσοτικά οι μεταβολίτες του dimethoate, DMP και DMTP. Οι υπό μελέτη μεταβολίτες του dimethoate δεν βρέθηκαν σε κανένα από τα δείγματα που συλλέχθηκε πριν από τη χορήγηση της πρώτης δόσης. Η Εικόνα 3.2 παρουσιάζει GC-MS (SIM) χρωματογραφήματα από τον προσδιορισμό των ουσιών αυτών. Στην Εικόνα 3.2A φαίνεται το χρωματογράφημα ενός τυφλού λευκού δείγματος τριχών κουνελιού φορτισμένο με DMP και DMTP (5 ng mg^{-1} για κάθε μεταβολίτη). Η Εικόνα 3.2B δείχνει το χρωματογράφημα του λευκού δείγματος τριχών ενός κουνελιού της ομάδας ελέγχου. Η Εικόνα 3.2C δείχνει το χρωματογράφημα του λευκού δείγματος τριχών ενός κουνελιού της ομάδας υψηλής δόσης (χορήγηση του dimethoate στη δόση 24 mg kg^{-1} σ.β. ημερησίως), το οποίο συλλέχθηκε τέσσερις μήνες μετά την έναρξη της κατανάλωσης επιμολυσμένου με dimethoate πόσιμου νερού. Στην τελευταία περίπτωση, οι μεταβολίτες DMP και DMTP ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις 0.26 και 1.19 ng mg^{-1} , αντίστοιχα.

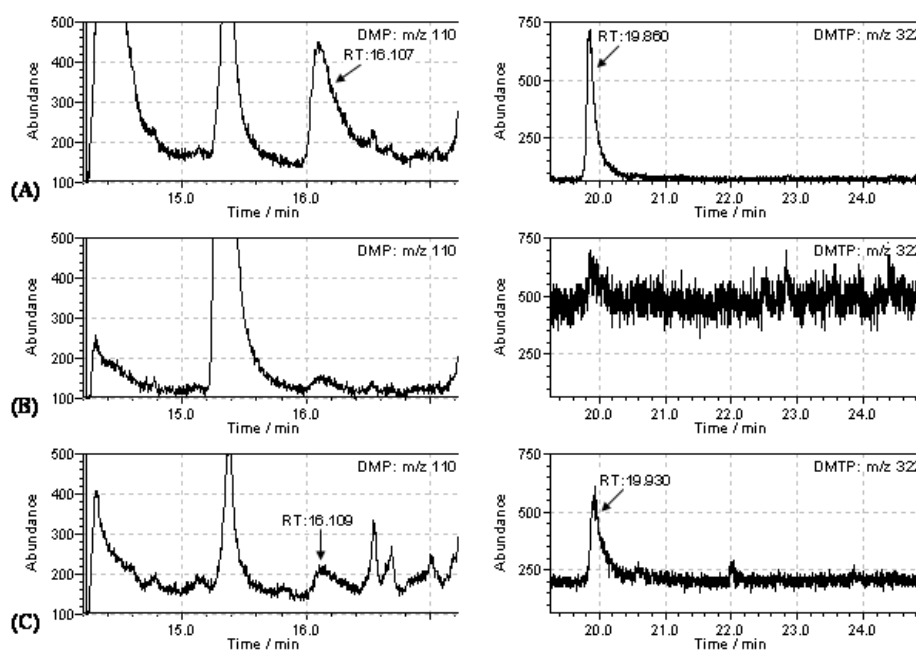
Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις των υπολειμμάτων δυο εκ των κυρίων μεταβολιτών του dimethoate στα λευκά και στα καφέ δείγματα τριχών κουνελιών των ομάδων ελέγχου, χαμηλής και υψηλής δόσης, καθώς και οι τυπικές τους αποκλίσεις. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα αυτό, υπολείμματα του DMP και του DMTP ανιχνεύθηκαν σε όλες τις ομάδες, εκτός από την ομάδα ελέγχου, και οι μέσες συγκεντρώσεις σε κάθε δειγματοληψία ήταν υψηλότερες για το DMTP και στα δυο χρώματα τρίχας. Όπως αναμενόταν, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις τόσο του DMP όσο και του DMTP σε κάθε δειγματοληψία παρατηρούνταν στην ομάδα υψηλής δόσης σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στην ομάδα χαμηλής δόσης και στην ομάδα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, το DMP παρουσίασε το υψηλότερο μέσο επίπεδο, 0.77 ng mg^{-1} , και οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν μεταξύ 0.70 και 0.82 ng mg^{-1} σε καφέ τρίχες από την ομάδα υψηλής δόσης έξι μήνες μετά την έναρξη της χορήγησης (Πίνακας 3.2α). Το

DMTP παρουσίασε το υψηλότερο μέσο επίπεδο, 1.53 ng mg^{-1} , με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 1.35 και 1.64 ng mg^{-1} σε λευκές τρίχες από την ομάδα υψηλής δόσης που συλλέχθηκαν έξι μήνες μετά την έναρξη της έκθεσης (Πίνακας 3.2β).

Συγκρίνοντας λευκά και καφέ δείγματα τριχών των ομάδων χαμηλής και υψηλής δόσης για τις τιμές συγκέντρωσης του DMP και του DMTP σε κάθε δειγματοληψία, είναι φανερό ότι η καφέ τρίχα εμφανίζει υψηλότερη μέση συγκέντρωση του DMP από ότι η λευκή ($P < 0.05$) (Πίνακας 3.2α), ενώ η μέση συγκέντρωση του DMTP στη λευκή τρίχα δεν διαφέρει σημαντικά από αυτήν που βρέθηκε στην καφέ ($P > 0.05$) (Πίνακας 3.2β). Ανάμεικτα αποτελέσματα για τη σημαντικότητα της σχέσης μεταξύ της διάρκειας χορήγησης και των επιπέδων των δυο DAPs στην τρίχα παρατηρούνται (Πίνακας 3.2).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στη διάρκεια των αναλύσεων των δειγμάτων τριχών κουνελιών παρατηρήθηκε μια κορυφή με χρόνο έκλουσης (18.537 min), ο οποίος συμπίπτει με αυτόν του DEP στα φορτισμένα δείγματα τριχών (18.430 min), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3. Το θετικό αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε με βάση τα δεδομένα από το φάσμα μάζας για τα ιόντα του DEP (m/z 197, 258, 334). Έτσι, η ανάλυση των μεταβολιτών του dimethoate οδήγησε επίσης και στην ανίχνευση του DEP στην πλειοψηφία των δειγμάτων τριχών από κουνέλια που εξετάστηκαν (Πίνακας 3.3). Η Εικόνα 3.3A δείχνει το χρωματογράφημα ενός τυφλού λευκού δείγματος τριχών κουνελιού φορτισμένο με DEP (5 ng mg^{-1}). Η Εικόνα 3.3B δείχνει το χρωματογράφημα του λευκού δείγματος τριχών κουνελιού της ομάδας υψηλής δόσης (χορήγηση του dimethoate στη δόση 24 mg kg^{-1} σ.β. ημερησίως) χωρίς γνωστή έκθεση στο DEP, το οποίο συλλέχθηκε τέσσερις μήνες μετά την έναρξη της κατανάλωσης επιμολυσμένου με dimethoate πόσιμου νερού και το οποίο βρέθηκε θετικό σε DEP (0.27 ng mg^{-1}). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι, όπως ήδη αναφέρθηκε, αυτός ο μεταβολίτης δεν βρέθηκε στα πέντε από τα εννέα κουνέλια πριν από τη χορήγηση της πρώτης δόσης, ενώ υπολείμματά του βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν από όλες τις ομάδες στη διάρκεια της χορήγησης του φαρμάκου (Πίνακας 3.3). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, γενικά, δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών υπό μελέτη ομάδων στα μέσα υπολειμματικά επίπεδα του DEP στην τρίχα και στις δυο δειγματοληψίες και για τα δυο χρώματα τρίχας ($P > 0.05$), ενώ η μέση συγκέντρωση όλων των ομάδων δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο δειγματοληψιών ($P = 0.494$ σε λευκές τρίχες και $P = 0.723$ σε καφέ τρίχες) και ήταν 0.17 και 0.16 ng mg^{-1} τέσσερις και έξι

μήνες, αντίστοιχα, αφού ξεκίνησε η χορήγηση του dimethoate και για τα δυο χρώματα τρίχας.



Εικόνα 3.2. GC-MS χρωματογραφήματα με τη μέθοδο της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM) ενός (A) τυφλού λευκού δείγματος τριχών κουνελιού φορτισμένο με 5 ng mg^{-1} από κάθε μεταβολίτη (dimethyl phosphate (DMP), dimethyl thiophosphate (DMTP)), (B) λευκού δείγματος τριχών κουνελιού της ομάδας ελέγχου, (C) λευκού δείγματος τριχών κουνελιού της ομάδας υψηλής δόσης.

Πίνακας 3.2

Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών του dimethoate (dimethyl phosphate (DMP), dimethyl thiophosphate (DMTP)) σε λευκά και καφέ δείγματα τριχών δίχρωμων κουνελιών καθημερινά εκτιθέμενων στο dimethoate για έξι μήνες

(α) Επίπεδα του DMP

Κουνέλι	Συγκέντρωση των εις τριπλούν αναλύσεων του DMP, σε ng mg ⁻¹ τριχών					
	Λευκές τρίχες			Καφέ τρίχες		
	4 ^{ος} μήνας έκθεσης ^a	6 ^{ος} μήνας έκθεσης ^b	Τιμή P ^c	4 ^{ος} μήνας έκθεσης ^a	6 ^{ος} μήνας έκθεσης ^b	Τιμή P ^c
<i>Ομάδα ελέγχου</i>						
Μεση Τιμή Ομάδας	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	
<i>Ομάδα χαμηλής δόσης (12 mg kg⁻¹ σ.β. ημ.⁻¹)</i>						
1	0.18	0.23		0.25	0.33	
2	0.18	0.25		0.27	0.34	
3	0.19	0.26		0.29	0.39	
Μέση Τιμή Ομάδας ± S.D.	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.011	0.27 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.011
Τιμή P ^d	0.002	0.007				
<i>Ομάδα υψηλής δόσης (24 mg kg⁻¹ σ.β. ημ.⁻¹)</i>						
1	0.35	0.50		0.66	0.82	
2	0.26	0.39		0.53	0.70	
3	0.37	0.40		0.59	0.78	
Μέση Τιμή Ομάδας ± S.D.	0.33 ± 0.06	0.43 ± 0.06	0.108	0.59 ± 0.07	0.77 ± 0.06	0.003
Τιμή P ^d	0.006	0.002				
Τιμή P ^e	0.014	0.007		0.001	0.000	

(β) Επίπεδα του DMTP

Κουνέλι	Συγκέντρωση των εις τριπλούν αναλύσεων του DMTP, σε ng mg ⁻¹ τριχών					
	Λευκές τρίχες			Καφέ τρίχες		
	4 ^{ος} μήνας έκθεσης ^a	6 ^{ος} μήνας έκθεσης ^b	Τιμή P ^c	4 ^{ος} μήνας έκθεσης ^a	6 ^{ος} μήνας έκθεσης ^b	Τιμή P ^c
<i>Ομάδα ελέγχου</i>						
Μέση Τιμή Ομάδας	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	
<i>Ομάδα χαμηλής δόσης (12 mg kg⁻¹ σ.β. ημ.⁻¹)</i>						
1	0.40	0.64		0.37	0.43	
2	0.56	0.79		0.48	0.70	
3	0.53	0.75		0.44	0.65	
Μέση Τιμή Ομάδας ± S.D.	0.50 ± 0.09	0.73 ± 0.08	0.001	0.43 ± 0.06	0.59 ± 0.14	0.087
Τιμή P ^d	0.319	0.230				
<i>Ομάδα υψηλής δόσης (24 mg kg⁻¹ σ.β. ημ.⁻¹)</i>						
1	1.13	1.59		0.99	1.39	
2	1.19	1.64		1.11	1.50	
3	0.92	1.35		0.77	0.91	
Μέση Τιμή Ομάδας ± S.D.	1.08 ± 0.14	1.53 ± 0.16	0.000	0.96 ± 0.17	1.27 ± 0.31	0.068
Τιμή P ^d	0.393	0.268				
Τιμή P ^e	0.004	0.001		0.007	0.028	

^a Τέσσερις μήνες μετά την έναρξη της κατανάλωσης επιμολυσμένου με dimethoate πόσιμου νερού.

^b Έξι μήνες μετά την έναρξη της κατανάλωσης επιμολυσμένου με dimethoate πόσιμου νερού.

^c Τιμές P που υπολογίζονται μεταξύ των δυο δειγματοληψιών.

^d Τιμές P που υπολογίζονται μεταξύ λευκού και καφέ χρώματος τρίχας ύστερα από τεσσάρων και έξι μηνών έκθεση.

^e Τιμές P που υπολογίζονται μεταξύ των ομάδων χαμηλής και υψηλής δόσης.

n.d.: not detectable (μη ανιχνεύσιμο).

S.D.: standard deviation (τυπική απόκλιση).

Πίνακας 3.3

Συγκέντρωση του diethyl phosphate (DEP) στα λευκά και καφέ δείγματα τριχών κουνελιών στη διάρκεια της πειραματικής μελέτης εναπόθεσης των μεταβολιτών του dimethoate (dimethyl phosphate (DMP), dimethyl thiophosphate (DMTP)) σε τρίχες

Κουνέλι	Συγκέντρωση των εις τριπλούν αναλύσεων του DEP, σε ng mg ⁻¹ τριχών							
	Λευκές τρίχες				Καφέ τρίχες			
	Αρχική ^a	1 ^η δειγματοληψία ^b	2 ^η δειγματοληψία ^c	Τιμή P ^d	Αρχική ^a	1 ^η δειγματοληψία ^b	2 ^η δειγματοληψία ^c	Τιμή P ^d
<i>Ομάδα Α^e</i>								
	1	n.d.	0.12	0.15	n.d.	0.18	0.15	
	2	n.d.	0.15	0.23	n.d.	0.20	0.27	
	3	0.10	0.22	0.30	0.10	0.23	0.33	
Μέση Τιμή Ομάδας ± S.D.		0.10*	0.16 ± 0.05	0.23 ± 0.08	0.10*	0.20 ± 0.03	0.25 ± 0.09	
<i>Ομάδα Β^f</i>								
	1	n.d.	0.10	0.10	n.d.	0.11	0.10	
	2	0.09	0.15	0.12	0.10	0.16	0.11	
	3	0.10	0.21	0.15	0.13	0.18	0.13	
Μέση Τιμή Ομάδας ± S.D.		0.10 ± 0.01*	0.15 ± 0.06	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.02*	0.15 ± 0.04	0.11 ± 0.02	
<i>Ομάδα C^g</i>								
	1	n.d.	0.20	0.12	n.d.	0.14	0.11	
	2	0.11	0.27	0.15	0.15	0.21	0.17	
	3	n.d.	0.15	0.10	n.d.	0.11	0.10	
Μέση Τιμή Ομάδας ± S.D.		0.11*	0.21 ± 0.06	0.12 ± 0.03	0.15*	0.15 ± 0.05	0.13 ± 0.04	
Μέση Τιμή Ομάδων ± S.D.		0.10 ± 0.01*	0.17 ± 0.05	0.16 ± 0.07	0.494	0.12 ± 0.02*	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.08
Τιμή P ^h			0.501	0.060		0.260	0.051	0.723

^a Πριν από την έναρξη της κατανάλωσης επιμολυσμένου με dimethoate πόσιμου νερού.

^b Τέσσερις μήνες μετά την έναρξη της κατανάλωσης επιμολυσμένου με dimethoate πόσιμου νερού.

^c Έξι μήνες μετά την έναρξη της κατανάλωσης επιμολυσμένου με dimethoate πόσιμου νερού.

^d Τιμές P που υπολογίζονται μεταξύ των δυο δειγματοληψιών.

^e Χορήγηση dimethoate από το στόμα στη δόση των 0 mg kg⁻¹ σ.β. ημερησίως.

^f Χορήγηση dimethoate από το στόμα στη δόση των 12 mg kg⁻¹ σ.β. ημερησίως.

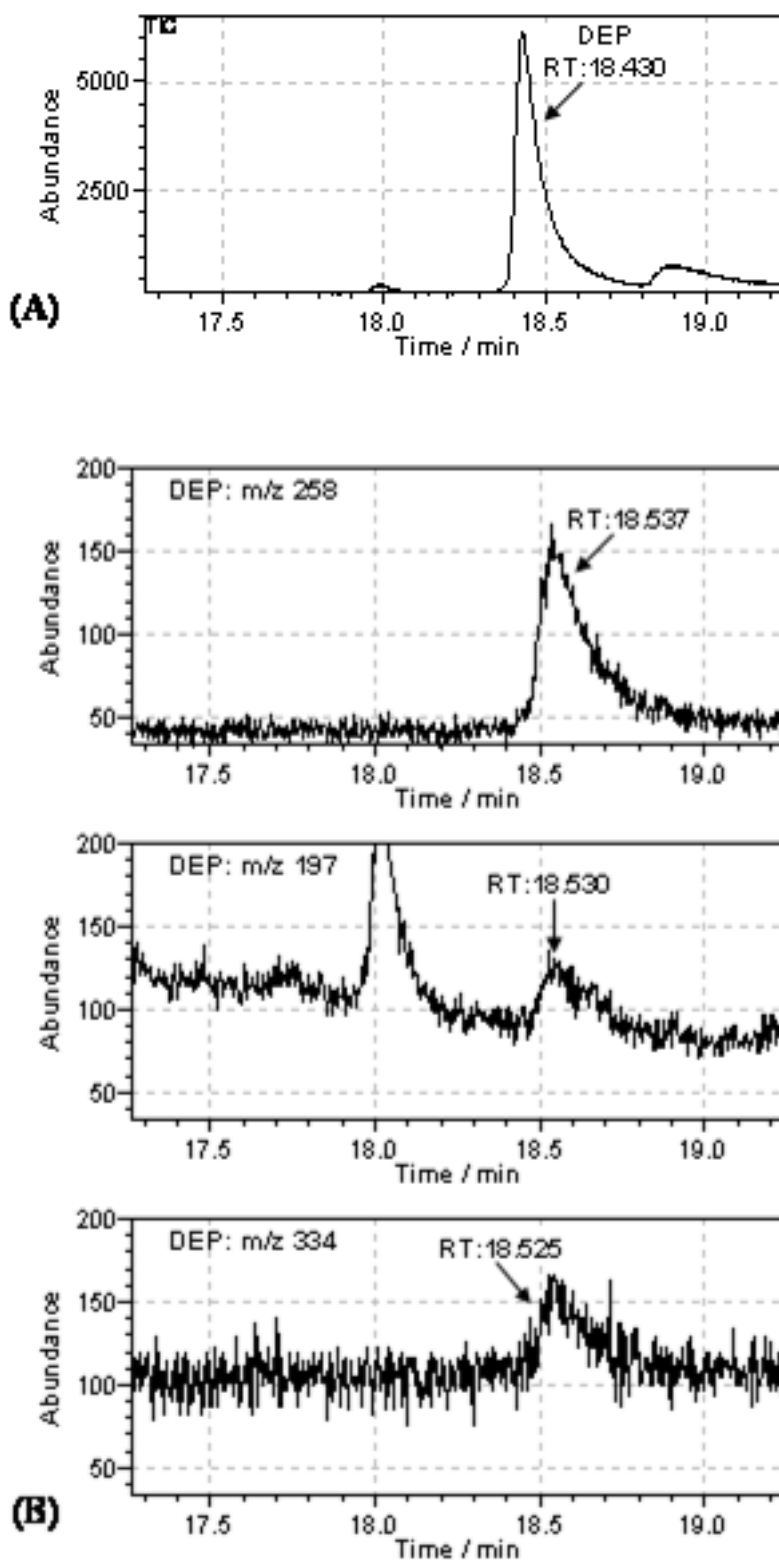
^g Χορήγηση dimethoate από το στόμα στη δόση των 24 mg kg⁻¹ σ.β. ημερησίως.

^h Τιμές P που υπολογίζονται μεταξύ των τριών ομάδων (A, B, C).

n.d.: not detectable (μη ανιχνεύσιμο).

S.D.: standard deviation (τυπική απόκλιση).

* Τα δεδομένα προέρχονται μόνο από τα θετικά δείγματα.



Εικόνα 3.3. GC-MS χρωματογραφήματα του diethyl phosphate (DEP) σε τρίχες κουνελιών. (A) Χρωματογράφημα του συνόλου των ιόντων (Total Ion Chromatogram, TIC) τυφλού λευκού δείγματος τριχών κουνελιού φορτισμένο σε επίπεδο συγκέντρωσης 5 ng mg^{-1} με τη μέθοδο της επιλεκτικής παρακολούθησης

ιόντων (SIM); (B) SIM χρωματογράφημα λευκού δείγματος τριχών κουνελιού της ομάδας υψηλής δόσης. Το ιόν ποσοτικού προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκε για το DEP ήταν το m/z 258.

3.2.3. Γενικές παρατηρήσεις

Σε αυτή την πειραματική εργασία, και στα έξι πειραματόζωα που χορηγήθηκε η ουσία dimethoate παρατηρήθηκαν συμπτώματα δηλητηρίασης και (μόνο) ένα κουνέλι το οποίο ακολουθούσε την υψηλής δόσης αγωγή πέθανε λίγες ώρες μετά την τελευταία δειγματοληψία. Αντίθετα, η ομάδα ελέγχου δεν εμφάνισε κανένα κλινικό σύμπτωμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι δυο από τα τρία κουνέλια της ομάδας υψηλής δόσης εμφάνισαν ηπιότερα συμπτώματα σε σύγκριση με εκείνα της ομάδας χαμηλής δόσης. Συγκεκριμένα, τα κυριότερα κλινικά συμπτώματα που παρατηρήθηκαν στα πειραματόζωα κατά την επανειλημμένη έκθεσή τους στο dimethoate ήταν αδυναμία, μυϊκά τινάγματα, ανορεξία και απώλεια βάρους, διάρροια (μαλακά, γλοιώδη κόπρανα), μειωμένη φυσική δραστηριότητα, τρέμουλο και λήθαργος. Επιπλέον, ένα από τα τρία κουνέλια της ομάδας χαμηλής δόσης παρουσίασε αίμα στα ούρα του. Σε αυτή την περίπτωση, η χορήγηση της δόσης διεκόπηκε για τέσσερις ημέρες και το αίμα δεν ξαναπαρουσιάστηκε. Ύστερα από περίπου 4-6 μηνών έκθεση, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην κατανάλωση της τροφής και στα σωματικά βάρη των κουνελιών και των δυο εκτιθέμενων ομάδων καθώς επίσης και στην ποσότητα των οργανικών τους αποβλήτων (κοπράνων και ούρων) σε σύγκριση με εκείνα των πειραματοζώων της ομάδας ελέγχου.

3.3. Μελέτη σε ανθρώπους

3.3.1. Αποτελέσματα αξιολόγησης της μεθόδου

Τα ιόντα των εξεταζομένων ουσιών που επιλέχθηκαν για τις αναλύσεις με τη μέθοδο SIM αναφέρθηκαν στη μελέτη σε πειραματόζωα (Ενότητα 3.2.1).

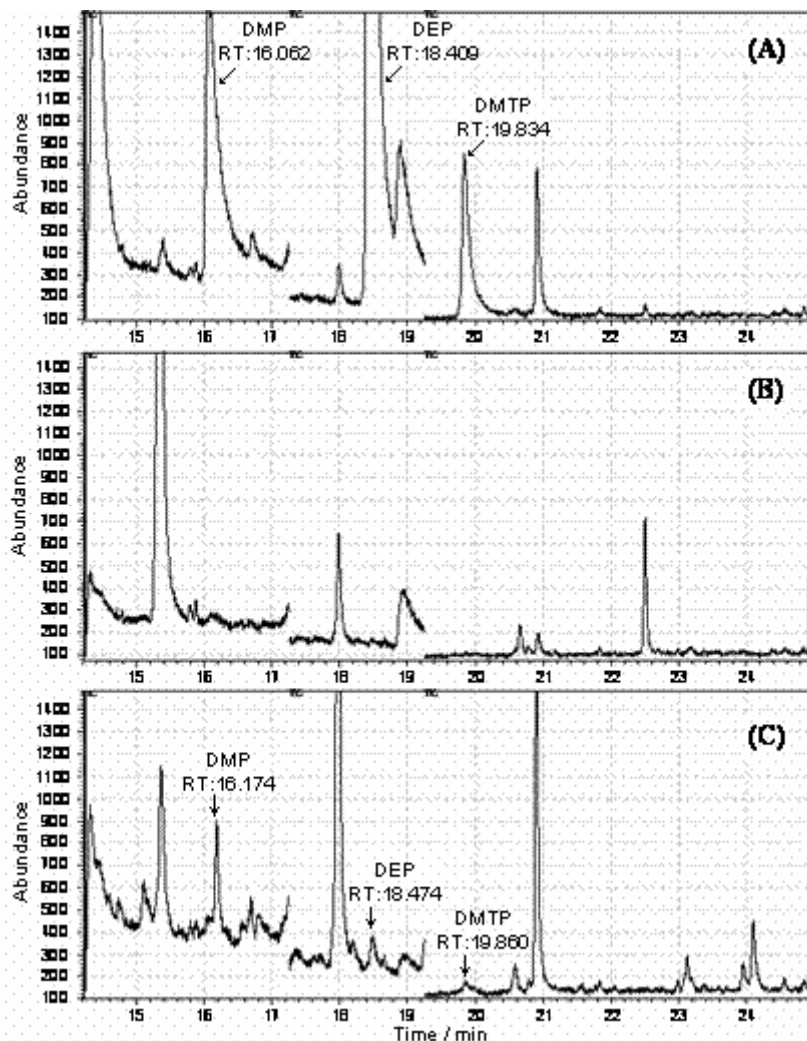
Στην Εικόνα 3.4A-C παρουσιάζονται GC-MS (SIM) χρωματογραφήματα από την ανάλυση υπολειμμάτων των τριών υπό μελέτη ουσιών σε δείγματα τριχών κεφαλής (τυφλό δείγμα φορτισμένο με 10 ng mg^{-1} από κάθε μεταβολίτη, ένα τυφλό

δείγμα, και ένα θετικό δείγμα ατόμου επαγγελματικά εκτιθέμενου στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα). Στο τελευταίο δείγμα, ανιχνεύτηκαν οι μεταβολίτες DMP, DEP και DMTP σε συγκεντρώσεις 0.46, 0.37 και 0.41 ng mg⁻¹, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα αυτή, το χρησιμοποιούμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αέριας χρωματογραφίας επιφέρει ικανοποιητικό διαχωρισμό όλων των ουσιών (εκτός του DEP) σε έναν εύλογο χρόνο ανάλυσης. Στα χρωματογραφήματα αυτά, εμφανίζεται επίσης και μια κορυφή πολύ κοντά στο DEP. Πρόκειται για μια παρεμβολή η οποία εκλύεται αμέσως (περίπου 0.5 min) μετά το DEP και η οποία παρεμβάλλεται κατά κάποιο τρόπο στην κορυφή του μεταβολίτη στο φορτισμένο δείγμα λόγω του tailing του DEP. Ωστόσο, παρά τη σχετικά χαμηλή αυτή ποιότητα διαχωρισμού η παρεμβολή αυτή έχει τον ίδιο λόγο *m/z* με αυτόν του δευτερεύοντος ιόντος που έχει καθορισθεί για την αναλυόμενη ένωση (*m/z* 197) και δεν δημιουργεί πρόβλημα αφού εξαφανίζεται (Εικόνα 3.5) όταν παρακολουθείται το ιόν ποσοτικού προσδιορισμού του DEP (*m/z* 258). Οι χρόνοι έκλυσης των ουσιών μας στις συγκεκριμένες συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης είναι 16.062 min (DMP), 18.409 min (DEP) και 19.834 min (DMTP) (Εικόνα 3.4A). Το σχήμα των κορυφών είναι ικανοποιητικό για όλες τις υπό εξέταση ουσίες τόσο στα φορτισμένα όσο και στα άγνωστα δείγματα (Εικόνα 3.4A και C), αν και όπως παρατηρούμε εμφανίζουν κάποιο tailing. Στα χρωματογραφήματα των δειγμάτων εμφανίζονται επίσης και μερικές άλλες μικρές σχετικά κορυφές των οποίων ο χρόνος έκλυσης δεν συμπίπτει με κανένα μεταβολίτη, και δεν δημιουργούν πρόβλημα στην ανίχνευση και στον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών που μας ενδιαφέρουν.

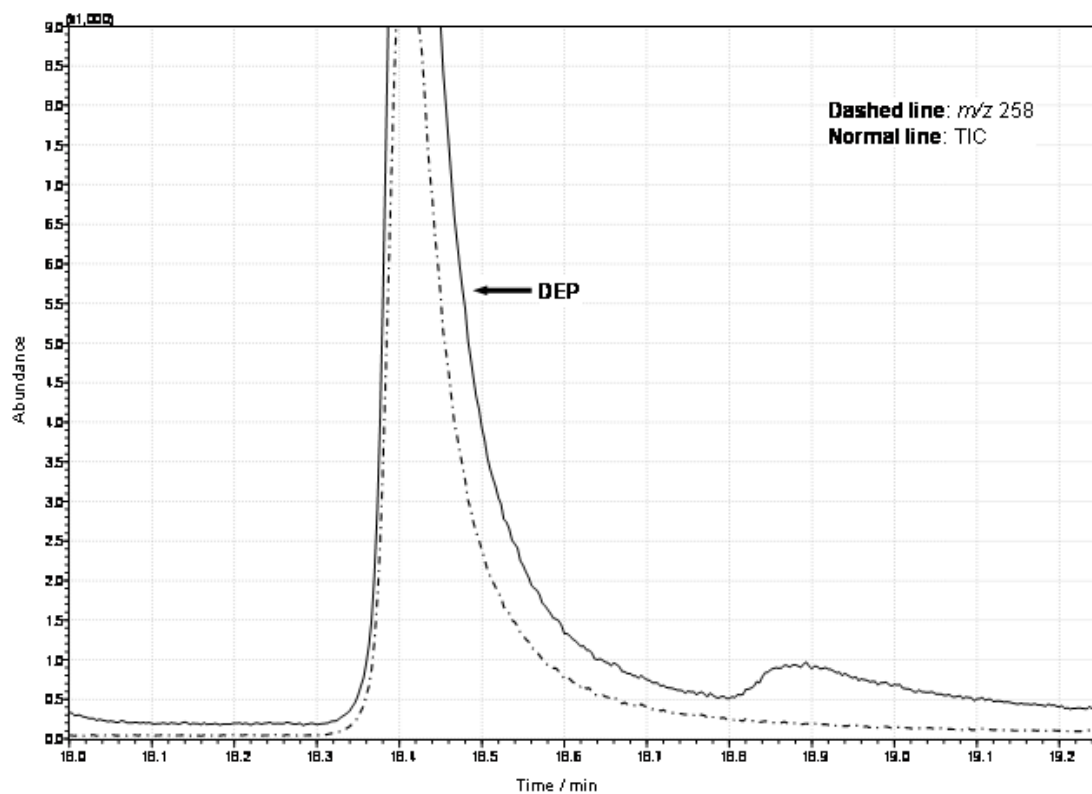
Οι καμπύλες αναφοράς (Παράρτημα Α.2) ήταν γραμμικές στην υπό εξέταση περιοχή συγκέντρωσης από 0.1 μέχρι 5 ng mg⁻¹ με συντελεστές γραμμικής συσχέτισης (R^2) 0.9956 για το DMP, 0.9995 για το DEP και 0.9987 για το DMTP (Πίνακας 3.4). Το σφάλμα στην κλίση των καμπυλών αναφοράς ήταν < 5%. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.4, τα όρια ανίχνευσης ήταν 0.10 ng mg⁻¹ για το DMP και το DMTP, και 0.02 ng mg⁻¹ για το DEP. Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού ήταν 0.33 ng mg⁻¹ για το DMP, 0.06 ng mg⁻¹ για το DEP και 0.34 ng mg⁻¹ για το DMTP.

Η επαναληπτικότητα και οι ανακτήσεις της μεθόδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4. Όπως φαίνεται στον Πίνακα αυτό, προέκυψαν (αναλύοντας δείγματα ανάκτησης σε ανθρώπινες τρίχες) καλές ανακτήσεις εκχύλισης για τους εξεταζόμενους μεταβολίτες που κυμαίνονταν μεταξύ 56.1 και 107.9%. Η σχετικά χαμηλή ανάκτηση του DMP συμφωνεί με την αναφερόμενη στη μελέτη σε τρίχες

κουνελιών. Η επαναληπτικότητα όλης της αναλυτικής μεθόδου εντός μιας ημέρας κυμαινόταν μεταξύ 13.5 και 17.5% για το επίπεδο φόρτισης 1 ng mg^{-1} , ενώ η μεταξύ των ημερών επαναληπτικότητα της μεθόδου κυμαινόταν από 11.1 μέχρι 16.2%. Επιπλέον, η επαναληπτικότητα του οργάνου εντός μιας ημέρας κυμαινόταν μεταξύ 2.0-4.9%, ενώ η μεταξύ των ημερών επαναληπτικότητα κυμαινόταν μεταξύ 8.7-12.9%.



Εικόνα 3.4. GC-MS χρωματογραφήματα του συνόλου των ιόντων (Total Ion Chromatograms, TICs) με τη μέθοδο της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM) ενός (A) τυφλού δείγματος τριχών φορτισμένο με 10 ng mg^{-1} από κάθε μεταβολίτη (dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), dimethyl thiophosphate (DMTP)), (B) τυφλού δείγματος τριχών, (C) δείγματος τριχών αγρότη.



Εικόνα 3.5. GC-MS χρωματογραφήματα με τη μέθοδο της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM) του diethyl phosphate (DEP) σε τυφλό δείγμα τριχών φορτισμένο σε επίπεδο συγκέντρωσης 10 ng mg^{-1} . Συνεχής γραμμή (normal line): χρωματογράφημα του συνόλου των ιόντων (Total Ion Chromatogram, TIC); διακεκομμένη γραμμή (dashed line): εξαγόμενο χρωματογράφημα όταν το ιόν ποσοτικού προσδιορισμού (m/z 258) του DEP έχει επιλεγεί να παρατηρείται.

Πίνακας 3.4

Παράμετροι γραμμικότητας, όρια ανίχνευσης (LODs), όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOQs), ανακτήσεις εκχύλισης και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSDs) για την ανάλυση των υπό μελέτη dialkyl phosphates (dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), dimethyl thiophosphate (DMTP)) σε ανθρώπινες τρίχες

Μεταβολίτης	Συντελ. γραμμικής συσχέτισης	Σφάλμα κλίσης (%)	Όριο ανίχνευσης (ng mg ⁻¹)	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (ng mg ⁻¹)	Ανάκτηση (%)		Επαναληπτικότητα μεθόδου, RSD (%)*		Επαναληπτικότητα οργάνου, RSD (%)*	
					1 ng mg ⁻¹	10 ng mg ⁻¹	Εντός ημέρας (n=3)	Μεταξύ ημερών (n=3)	Εντός ημέρας (n=5)	Μεταξύ ημερών (n=4)
DMP	0.9956	4.7	0.10	0.33	56.1	66.5	13.5	11.2	3.9	8.7
DEP	0.9995	0.8	0.02	0.06	61.1	98.9	15.4	11.1	4.9	12.9
DMTP	0.9987	2.6	0.10	0.34	97.7	107.9	17.5	16.2	2.0	11.3

* Τα δεδομένα προέρχονται από φορτισμένα δείγματα τριχών στο επίπεδο συγκέντρωσης 1 ng mg⁻¹.

3.3.2. Αποτελέσματα αναλύσεων των DAPs σε δείγματα τριχών ανθρώπων

Η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς για τη μέτρηση της έκθεσης τριάντα καλλιεργητών στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα. Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των αναλύσεων των DAPs στα εξετασθέντα δείγματα τριχών. Συγκεκριμένα, από τα τριάντα δείγματα που ελέγχθηκαν στα είκοσι τέσσερα, δηλαδή σε ποσοστό 80%, ανιχνεύτηκε τουλάχιστον ένας από τους υπό μελέτη μεταβολίτες, ενώ στα έξι από τα τριάντα δείγματα, δηλαδή σε ποσοστό 20%, ανιχνεύθηκαν όλες οι εξεταζόμενες ουσίες. Αντίθετα, στο 20% των δειγμάτων δεν ανιχνεύτηκε κανένας από τους υπό εξέταση μεταβολίτες. Υπολείμματα του DEP και του DMTP ανιχνεύτηκαν στο 70% και στο 20% περίπου των δειγμάτων, αντίστοιχα, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0.32 μέχρι 0.44 ng mg⁻¹ και από 0.32 μέχρι 0.41 ng mg⁻¹, αντίστοιχα. Το DMP εντοπίστηκε στο 40% περίπου των εξεταζομένων δειγμάτων σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 0.10 και 0.46 ng mg⁻¹.

Πίνακας 3.5

Συγκεντρώσεις των υπό μελέτη dialkyl phosphates (dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), dimethyl thiophosphate (DMTP)) σε δείγματα τριχών 30 Ελλήνων καλλιεργητών καθώς και ο αριθμός και το ποσοστό των θετικών δειγμάτων

Μεταβολίτης	Μέση τιμή συγκέντρωσης (ng mg ⁻¹)	Εύρος συγκέντρωσης (ng mg ⁻¹)	Αριθμός θετικών δειγμάτων	Συχνότητα ανίχνευσης (%)
DMP	0.24	0.10-0.46	12	40
DEP	0.36	0.32-0.44	21	70
DMTP	0.36	0.32-0.41	6	20

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Μελέτη σε πειραματόζωα

Αυτή η *in vivo* (σε ζωντανούς οργανισμούς) έρευνα αναφέρεται στην ποσοτική ανάλυση δυο DAP μεταβολιτών του dimethoate, του DMP και του DMTP, σε δείγματα τριχών από κουνέλια εκτιθέμενα για μεγάλο χρονικό διάστημα στο εν λόγω φυτοφάρμακο. Λόγω της ιδιαίτερης σπουδαιότητας του προσδιορισμού των DAPs στην τρίχα για την εκτίμηση της χρόνιας συσσωρευτικής έκθεσης στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, συλλέγονται σε αυτή τη φάση πληροφορίες απαραίτητες σχετικά με την κατακράτηση των ουσιών αυτών στις τρίχες σε μια μελέτη κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Τα αποτελέσματά μας συνηγορούν ότι οι πιο πάνω μεταβολίτες μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό (από το πεπτικό σύστημα) με την κατάποση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων, όπως είναι το dimethoate, και στη συνέχεια να ενσωματωθούν στην τρίχα. Η προτεινόμενη αναλυτική μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στην παρακολούθηση υπολειμμάτων τους στην τρίχα προκειμένου να εκτιμηθεί η ενδογενής έκθεση στα προαναφερθέντα φυτοφάρμακα. Επιπλέον, η ανάλυση των μεταβολιτών στην τρίχα χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας επιβεβαιώνει ότι το dimethoate στα κουνέλια μεταβολίζεται προς DMP και DMTP.

Από τα δεδομένα του Πίνακα 3.2 φαίνεται ότι και για τους δυο μεταβολίτες φαίνεται να υπάρχει μια σημαντική σχέση μεταξύ της μέσης συγκέντρωσης του μεταβολίτη στην τρίχα και της χορηγούμενης δόσης του dimethoate (με P τιμές που κυμαίνονται από 0.000 μέχρι 0.014 για το DMP (Πίνακας 3.2α) και από 0.001 μέχρι 0.028 για το DMTP (Πίνακας 3.2β)). Επιπλέον, τα μέσα επίπεδα του κάθε μεταβολίτη στις τρίχες των κουνελιών υψηλής δόσης (24 mg kg⁻¹ σ.β. ημερησίως) ήταν περίπου 2.0 (ή η μέση τιμή ήταν 2.0 για το DMP και 2.2 για το DMTP) φορές μεγαλύτερα από ότι στη δόση των 12 mg kg⁻¹.

Συγκεκριμένα, το DMP βρέθηκε στις τρίχες των εκτιθέμενων κουνελιών, και στα δυο χρώματα τρίχας, σε (μέσες) συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0.18-0.27 ng mg⁻¹ (μέση τιμή, 0.23 ng mg⁻¹), ύστερα από τεσσάρων μηνών έκθεση και 0.25-0.35 ng mg⁻¹ (μέση τιμή, 0.30 ng mg⁻¹) ύστερα από έξι μηνών έκθεση, για

την ομάδα χαμηλής δόσης, και μεταξύ 0.33-0.59 ng mg⁻¹ (μέση τιμή, 0.46 ng mg⁻¹) και 0.43-0.77 ng mg⁻¹ (μέση τιμή, 0.60 ng mg⁻¹), αντίστοιχα, για την ομάδα υψηλής δόσης (Πίνακας 3.2α). Το DMTP ανιχνεύτηκε σε (μέσες) συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0.43-0.50 ng mg⁻¹ (μέση τιμή, 0.47 ng mg⁻¹), ύστερα από τεσσάρων μηνών έκθεση και 0.59-0.73 ng mg⁻¹ (μέση τιμή, 0.66 ng mg⁻¹) ύστερα από έξι μηνών έκθεση, για την ομάδα χαμηλής δόσης, και μεταξύ 0.96-1.08 ng mg⁻¹ (μέση τιμή, 1.02 ng mg⁻¹) και 1.27-1.53 ng mg⁻¹ (μέση τιμή, 1.40 ng mg⁻¹), αντίστοιχα, για την ομάδα υψηλής δόσης (Πίνακας 3.2β). Ωστόσο, όπως ήδη αναφέρθηκε, κατά τη διάρκεια της μελέτης παρατηρήθηκε ότι δυο από τα τρία κουνέλια της ομάδας υψηλής δόσης εμφάνισαν ηπιότερα συμπτώματα σε σύγκριση με εκείνα της ομάδας χαμηλής δόσης. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στον εθισμό αυτών των κουνελιών στο χορηγούμενο φάρμακο.

Επιπλέον, συγκρίνοντας τις μέσες συγκεντρώσεις του DMP και του DMTP μεταξύ των δυο δειγματοληψιών, παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις τους στις τρίχες των κουνελιών αυξήθηκαν στη διάρκεια της μελέτης, όπως αναμενόταν, και στα δυο επίπεδα δόσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.2α φαίνεται να υπάρχει μια σημαντική σχέση μεταξύ της διάρκειας χορήγησης του φαρμάκου και της μέσης συγκέντρωσης του DMP στην ομάδα χαμηλής δόσης (P=0.011 και για τα δυο χρώματα τρίχας). Ωστόσο, στην ομάδα υψηλής δόσης βρέθηκε μια σημαντική σχέση μεταξύ των μέσων τιμών συγκέντρωσης του DMP και της διάρκειας χορήγησης μόνο στις καφέ τρίχες (P=0.003). Όσο για το DMTP, η σχέση μεταξύ διάρκειας χορήγησης και μέσης συγκέντρωσης φαίνεται να είναι σημαντική μόνο στις λευκές τρίχες (P=0.001 για την ομάδα χαμηλής δόσης και P=0.000 για την ομάδα υψηλής δόσης) (Πίνακας 3.2β).

Όσον αφορά την επίδραση του χρώματος της τρίχας στις ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών, στην παρούσα μελέτη για το DMP βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα μέσα επίπεδα στην καφέ τρίχα από ότι στη λευκή (P=0.002 και P=0.007 ύστερα από τεσσάρων και έξι μηνών έκθεση, αντίστοιχα, για την ομάδα χαμηλής δόσης και P=0.006 και P=0.002, αντίστοιχα, για την ομάδα υψηλής δόσης) (Πίνακας 3.2α), ενώ δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στα μέσα επίπεδα του DMTP των πειραματοζώων λόγω του χρώματος (P=0.319 και P=0.230 ύστερα από τεσσάρων και έξι μηνών έκθεση, αντίστοιχα, για την ομάδα χαμηλής δόσης και P=0.393 και P=0.268, αντίστοιχα, για την ομάδα υψηλής δόσης) (Πίνακας 3.2β). Η σπουδαιότητα του χρώματος της τρίχας στην εναπόθεση τοξικών χημικών ουσιών δεν

έχει ακόμα διευκρινισθεί πλήρως. Κάποιες μελέτες αναφέρουν ότι αυτός ο παράγοντας δεν φαίνεται να επηρεάζει τις μετρήσεις των επιπέδων (Kelly et al., 2000; Mieczkowski and Newel, 2000), ενώ άλλες μελέτες δείχνουν ότι η μελανίνη που περιέχεται στις τρίχες δρά ως ένα μέσο δέσμευσης διαφόρων τοξικών χημικών ουσιών (Uematsu et al., 1990; Joseph et al., 1996; Slawson et al., 1998; Rollins et al., 2003).

Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι ενώ το χρώμα των μαλλιών φαίνεται να επηρεάζει τις μετρήσεις των επιπέδων του DMP, εν τούτοις δεν φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην εναπόθεση του DMTP. Ωστόσο, ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη είναι σχετικά μικρός και ένας πολύ μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων θα πρέπει ακόμα να αναλυθεί προκειμένου να επαληθευτούν αυτά τα ευρήματα.

Στη μελέτη αυτή, εντοπίστηκαν επίσης κορυφές του DEP στην πλειοψηφία των δειγμάτων τριχών των πειραματοζώων που αναλύθηκαν (Πίνακας 3.3). Η πηγή προέλευσης του DEP σε αυτό το πείραμα είναι άγνωστη. Αυτή η έκθεση ίσως να έχει προκληθεί από πρόσληψη αυτούσιων των diethyl οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και/ή των υπολειμμάτων του DEP μέσω της διατροφής (υπολείμματα στην κουνελοτροφή) και/ή του πόσιμου νερού. Το DEP είναι ένας από τους κύριους μεταβολίτες πολλών diethyl οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων (Whyatt and Barr, 2001), όπως το diazinon, το chlorpyrifos, το disulfoton, που είναι εντομοκτόνα ευρέως χρησιμοποιούμενα στη γεωργία.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή είναι η πρώτη εργασία που μελετάει *in vivo* την επίδραση του επιπέδου της δόσης και της διάρκειας χορήγησης ενός οργανοφωσφορικού φυτοφαρμάκου, καθώς επίσης και την επίδραση του χρώματος της τρίχας στις συγκεντρώσεις των DAP μεταβολιτών του στην τρίχα. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι φαίνεται να υπάρχει μια σημαντική σχέση μεταξύ των τιμών συγκέντρωσης των δυο μετρούμενων DAPs στην τρίχα και του επιπέδου της δόσης του χορηγούμενου φαρμάκου. Από την άλλη μεριά, ανάμεικτα αποτελέσματα για τη σημαντικότητα της σχέσης μεταξύ της διάρκειας χορήγησης και των επιπέδων των δυο DAPs στην τρίχα παρατηρούνται. Το χρώμα της τρίχας δεν φαίνεται να επηρεάζει την κατακράτηση του DMTP, ενώ φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην εναπόθεση του DMP.

Ωστόσο, η αξία τέτοιων μελέτων σε πειραματόζωα περιορίζεται από ένα πλήθος παραγόντων. Τα αποτελέσματα από τις μελέτες σε ζώα πρέπει να

χρησιμοποιηθούν για την εξήγηση των αποτελεσμάτων σε ανθρώπους. Όμως, όλες αυτές οι παράμετροι μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων βιολογικών ειδών. Συνεπώς, διάφοροι παράμετροι πρέπει να μελετηθούν πριν την επέκταση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης (σε κουνέλια) σε άλλα είδη και στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, παράγοντες όπως διαφορές στο μεταβολισμό και διαφορές στην ανάπτυξη της τρίχας και στα κλινικά συμπτώματα πρέπει να ληφθούν υπόψη. Επίσης, διάφορες άλλες παράμετροι όπως το γεγονός ότι οι άνθρωποι και μερικά ζώα ιδρώνουν ενώ κάποια άλλα, όπως τα κουνέλια, όχι ίσως επηρεάζουν τις ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις αφού διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η απέκκριση αυτών των υδατοδιαλυτών μεταβολιτών μπορεί να γίνει και από τον ιδρώτα (Duggan et al., 2003) και τοξικές χημικές ουσίες που αποβάλλονται στον ιδρώτα μπορούν να ενσωματωθούν στην τρίχα. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, η παρουσία του DMP και του DMTP σε δείγματα τριχών από ζώα στα οποία χορηγείται η ουσία από το στόμα απέδειξε ότι αυτοί οι μεταβολίτες μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό και να ενσωματωθούν στην τρίχα εσωτερικά (σε αντίθεση με την εξωτερική επιμόλυνση λόγω της ατμοσφαιρικής εναπόθεσης).

Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας σαφώς αποδεικνύουν τη δυνατότητα εκτίμησης της χρόνιας συσσωρευτικής έκθεσης στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα με την ανίχνευση των DAP μεταβολιτών στις τρίχες, επιτρέποντας έτσι την παρακολούθηση της χρόνιας επαγγελματικής και/ή περιβαλλοντικής έκθεσης του ανθρώπου σε επιδημιολογικές και άλλες κλινικές μελέτες. Όμως, όπως ήδη αναφέρθηκε, χωρίς να μπορεί να προσδιορισθεί ποιο συγκεκριμένο φυτοφάρμακο έχει προκαλέσει την έκθεση. Είναι όμως δυνατόν να βρεθεί η κατηγορία των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων (dimethyl οργανοφωσφορικά (π.χ. dimethoate, malathion, methidathion) και diethyl οργανοφωσφορικά (π.χ. diazinon, chlorpyrifos, disulfoton)) που προκάλεσε την έκθεση από τα επίπεδα των dimethyl phosphate (DMP, DMTP, DMDTP) και diethyl phosphate (DEP, DETP, DEDTP) μεταβολιτών.

4.2. Μελέτη σε ανθρώπους

Αν και είναι δύσκολο να γίνει σύγκριση με άλλα βιολογικά υλικά, αξίζει να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη τα ανιχνευόμενα επίπεδα των μεταβολιτών στα δείγματα τριχών από αγρότες που εξετάστηκαν ήταν γενικά χαμηλότερα σε σχέση με

εκείνα που είχαν προηγουμένως βρεθεί στο μηκόνιο και υψηλότερα από εκείνα που είχαν εντοπιστεί στο αμνιακό υγρό και τα ούρα σε διάφορες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν και αφορούσαν επαγγελματική ή περιβαλλοντική έκθεση (Πίνακας 4.1). Από τα δεδομένα του Πίνακα 4.1 φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των τριών DAPs που μελετούνται ποικίλλουν ανάλογα με το υπόστρωμα και τον εξεταζόμενο πληθυσμό (είδος έκθεσης) (με ή χωρίς επαγγελματική έκθεση και περιστατικά οξείων δηλητηριάσεων). Για παράδειγμα, στο μηκόνιο (Whyatt and Barr, 2001) ανιχνεύτηκαν οι μεταβολίτες DMP και DEP σε συγκεντρώσεις 16.00 ng mg^{-1} (16000 ng mL^{-1}) και $0.80\text{-}3.20 \text{ ng mg}^{-1}$ ($800\text{-}3200 \text{ ng mL}^{-1}$), αντίστοιχα, που είναι σημαντικά υψηλότερες από ότι στα ούρα και τις τρίχες επαγγελματικά ή μη επαγγελματικά εκτιθέμενων πληθυσμών, και είναι πιθανό να οφείλονται στην αυξημένη χρήση προϊόντων οικιακής χρήσης που περιέχουν οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα στις οικιακές εγκαταστάσεις της υπό μελέτη περιοχής. Όσον αφορά το αμνιακό υγρό (Bradman et al., 2003), ανιχνεύτηκαν οι μεταβολίτες DMP, DEP και DMTP σε συγκεντρώσεις $0.30\text{-}0.34 \text{ ng mL}^{-1}$, $0.26\text{-}0.36 \text{ ng mL}^{-1}$ και 0.43 ng mL^{-1} , αντίστοιχα.

Από τις μελέτες των DAPs στα ούρα φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις τους στους επαγγελματικά εκτιθέμενους είναι γενικά μεγαλύτερες από ότι στο γενικό πληθυσμό (Πίνακας 4.1). Μια πρόσφατη μελέτη (Ueyama et al., 2006) έχει αναφέρει την ανίχνευση των DMP, DEP και DMTP σε μέσες συγκεντρώσεις 22.7, 0.4 και 4.1 ng mL^{-1} , αντίστοιχα, σε άτομα που είναι επαγγελματικά εκτιθέμενα σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα. Σε μια άλλη μελέτη (Hernández et al., 2002), το DEP εντοπίστηκε σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 30 και 100 ng mL^{-1} στα ούρα αγροτών εκτιθέμενων στο chlorpyrifos. Η ίδια ομάδα επιστημόνων έχει πρόσφατα ανιχνεύσει τα DMP και DMTP στα επίπεδα συγκέντρωσης 52 και 47 ng mL^{-1} , αντίστοιχα, στα δείγματα ούρων ενός καλλιεργητή μετά από εφαρμογή του methyl parathion (Hernández et al., 2004). Όσον αφορά το γενικό πληθυσμό, τα αποτελέσματα των DAPs στα ούρα δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων μελετών. Συνοπτικά, οι μέσες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που ανιχνεύτηκαν στα ούρα ήταν $13\text{-}30 \text{ ng mL}^{-1}$ (DMP), $0.7\text{-}4.5 \text{ ng mL}^{-1}$ (DEP) και $1.1\text{-}22 \text{ ng mL}^{-1}$ (DMTP) (Hardt and Angerer, 2000; Oglobline et al., 2001; Dulaurent et al., 2006; Ueyama et al., 2006).

Τέλος, τα DAPs έχουν μετρηθεί και σε περιπτώσεις οξείων δηλητηριάσεων από οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα. Στις περιπτώσεις αυτές, τα επίπεδα των DAPs

στα ούρα (Tarbah et al., 2004) είναι πολύ υψηλότερα σε σχέση με εκείνα που έχουν μετρηθεί σε εκτιθέμενες και μη εκτιθέμενες ομάδες (Πίνακας 4.1). Τα επίπεδα του DMP στο αίμα είναι επίσης πολύ υψηλότερα από εκείνα στις τρίχες επαγγελματικά εκτιθέμενων ανθρώπων. Πιο συγκεκριμένα, σε μια περίπτωση δηλητηρίασης από phosphamidon, το DMP ανιχνεύτηκε στα δείγματα αίματος του ασθενούς σε συγκεντρώσεις που έφταναν τα 3900 και 4900 ng mL⁻¹ (Tarbah et al., 2004). Κάποιοι άλλοι επιστήμονες (Drevenkar et al., 1994) έχουν αναφέρει περιστατικά στα οποία οι συγκεντρώσεις του DEP κυμαίνονταν μεταξύ 200 και 8530 ng mL⁻¹ σε δείγματα πλάσματος ατόμων δηλητηριασμένων από οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα.

Στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μεταβολίτης με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στις αναλύσεις ήταν ο DEP (σε ποσοστό 70%). Αυτό επιβεβαιώνει την αναφερόμενη αυξημένη χρήση των diethyl οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων (π.χ. diazinon, chlorpyrifos) στις υπό μελέτη αγροτικές περιοχές σε σχέση με τα dimethyl οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα (π.χ. methyl parathion, dimethoate), των οποίων η χρήση είναι κάπως μικρότερη. Επιπλέον, στα μισά από τα (12) δείγματα που βρέθηκαν θετικά σε DMP, ανιχνεύτηκαν και υπολείμματα του DMTP. Αυτό ίσως επιβεβαιώνει την αναφερόμενη εφαρμογή φυτοφαρμάκων τα οποία παράγουν μόνο DMP, όπως το dichlorvos ή το dicrotophos. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι επειδή οι dialkyl phosphate μεταβολίτες σχηματίζονται από τα περισσότερα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που ανιχνεύτηκαν στις τρίχες των αγροτών αντιπροσωπεύουν τη χρόνια έκθεση σε πολλαπλά οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα. Από την άλλη μεριά, πιθανότατα η ύπαρξη αυτών των καταλοίπων στις τρίχες δεν συνδέεται μόνο με επαγγελματική έκθεση αλλά και με έκθεση σε αυτούσια τα φυτοφάρμακα ή και στους ίδιους τους μεταβολίτες μέσω της διατροφής και της κατανάλωσης νερού.

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν την παρουσία και τη συνύπαρξη υπολειμμάτων των τριών υπό εξέταση μεταβολιτών σε αυτό τον μικρό αριθμό δειγμάτων τριχών από αγρότες που εξετάστηκαν, καταδεικνύοντας ότι η μέτρηση των επιπέδων τους θα πρέπει να συμπεριληφθεί στις αναλύσεις ρουτίνας της τρίχας. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που προτείνει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό DAP μεταβολιτών στην τρίχα και είναι ιδιαίτερος σημαντική διότι αποδεικνύει ότι η τρίχα θα μπορούσε να αποτελέσει πολύτιμη εναλλακτική λύση

έναντι ενός ευρέως φάσματος βιολογικών δειγμάτων, όπως το αίμα, τα ούρα κ.λ.π., για την ανάλυση των εξεταζομένων ουσιών.

Η εφαρμογή της μεθόδου στην ανάλυση δειγμάτων τριχών αγροτών επαγγελματικά εκτιθέμενων στα προαναφερθέντα φυτοφάρμακα απέδειξε τη χρησιμότητα της μεθόδου και την αποτελεσματικότητά της. Η μελέτη όμως μπορεί να επεκταθεί και σε μη εκτιθέμενο πληθυσμό. Η υψηλή ευαισθησία της παρούσας αναλυτικής μεθόδου καθιστά δυνατή τη μέτρηση των επιπέδων του κάθε μεταβολίτη σε τρίχες μη επαγγελματικά εκτιθέμενου πληθυσμού, όπου υπάρχει έκθεση κυρίως μέσω της τροφής και του νερού, έτσι ώστε να μπορέσουμε να συγκρίνουμε το μέγεθος της έκθεσης των μη εκτιθέμενων πληθυσμών με αυτό των εκτιθέμενων.

Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι παρά τη δυσκολία που αντιμετωπίζεται στην εξήγηση των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων στην τρίχα (Zhang et al., 2007; Schramm, 2008), τα αποτελέσματά μας σαφώς αποδεικνύουν την ικανότητα εκτίμησης της χρόνιας ανθρώπινης έκθεσης στα φυτοφάρμακα που παρέχει σημαντικές πληροφορίες σε επιδημιολογικές και σε άλλες κλινικές μελέτες, και ανοίγουν νέους ορίζοντες στην έρευνα για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μεταβολιτών φυτοφαρμάκων σε τρίχες.

Πίνακας 4.1

Συγκεντρώσεις των υπό μελέτη dialkyl phosphates (dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), dimethyl thiophosphate (DMTP)) σε δείγματα τριχών, ούρων, μηκώνιου, αμνιακού υγρού, αίματος και πλάσματος από επαγγελματικά (Hernández et al., 2002; 2004; Ueyama et al., 2006) και μη επαγγελματικά (Hardt and Angerer, 2000; Whyatt and Barr, 2001; Oglobline et al., 2001; Bradman et al., 2003; Dulaurent et al., 2006; Ueyama et al., 2006) εκτιθέμενους πληθυσμούς, καθώς και από περιστατικά οξείων δηλητηριάσεων (Drevenkar et al., 1994; Tarbah et al., 2004)

Μεταβολίτης	Συγκεντρώσεις dialkyl phosphates, εύρος (μέση τιμή) σε ppb							
	Εκτιθέμενος πληθυσμός		Γενικός πληθυσμός			Περιστατικά δηλητηριάσεων		
	Ούρα (ng mL ⁻¹)	Τρίχες (pg mg ⁻¹)	Ούρα (ng mL ⁻¹)	Μηκώνιο (pg mg ⁻¹)	Αμνιακό υγρό (ng mL ⁻¹)	Αίμα (ng mL ⁻¹)	Πλάσμα ^a	Ούρα (ng mL ⁻¹)
DMP	22.7-52	100-460 (240)	13-30	16000	0.30-0.34 (0.32)	3900-4900 (4400)		33500-50400 (41950)
DEP	0.4-100	320-440 (360)	0.7-4.5	800-3200 (1540)	0.26-0.36 (0.31)	200-8530 (2244) ^a		
DMTP	4.1-47	320-410 (360)	1.1-22	n.d.	0.43			

Οι συγκεντρώσεις στις τρίχες και το μηκώνιο εκφράζονται σε pg mg⁻¹ ώστε να είναι στην ίδια κλίμακα με αυτές των ούρων, του αίματος, του πλάσματος και του αμνιακού υγρού (ng mL⁻¹).

n.d.: not detectable (μη ανιχνεύσιμο).

4.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της αναλυτικής μεθόδου

Η μεθοδολογία που παρουσιάστηκε εμφανίζει καλή γραμμικότητα, ικανοποιητική επαναληπτικότητα, υψηλή ευαισθησία και καλές ανακτήσεις για μια τόσο περίπλοκη ανάλυση όπως είναι η ανάλυση υπολειμμάτων μεταβολιτών στην τρίχα και μάλιστα χωρίς να χρησιμοποιηθεί κανένα εσωτερικό πρότυπο. Παρά τα ικανοποιητικά αποτελέσματα που λαμβάνονται, η παραπάνω μέθοδος είναι πιθανό να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω κάνοντας χρήση ενός κατάλληλου εσωτερικού προτύπου. Τα όρια ανίχνευσης των εξεταζομένων ουσιών είναι καλύτερα από εκείνα που αναφέρθηκαν στο μηκόνιο (0.51, 0.2 και 0.18 ng mg⁻¹ για τα DMP, DEP και DMTP, αντίστοιχα) (Whyatt and Barr, 2001). Επιπλέον, η ευαισθησία της μεθόδου είναι μεγαλύτερη από εκείνη προηγούμενων μεθόδων (Ostrea et al., 2006; Posecion et al., 2006) που μετρούν μεταβολίτες φυτοφαρμάκων στην τρίχα (LODs, 0.18-5.88 ng mg⁻¹).

Η διαδικασία είναι σχετικά εύκολη και γρήγορη. Ένα εκπαιδευμένο άτομο μπορεί να επεξεργαστεί τουλάχιστον 50 δείγματα σε 4-5 ημέρες. Άλλα σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η απλή διαδικασία εξαγωγής των dialkyl phosphates από την τρίχα (εκχύλιση με νερό), οι ασφαλείς χειρισμοί, η χαμηλή ποσότητα δείγματος (50 mg) και οι σχετικά μικρές ποσότητες ακριβών και επικίνδυνων διαλυτών που καταναλώνονται. Η μεθοδολογία μας απαιτεί σχετικά απλό εργαστηριακό εξοπλισμό και μέτρια GC-MS οργανολογία που υπάρχει στα περισσότερα εργαστήρια ρουτίνας. Επομένως, πληρεί τις προδιαγραφές μιας μεθόδου ρουτίνας.

Επιπλέον, η ικανότητα μέτρησης των DAP μεταβολιτών σε δείγματα τριχών επιτρέπει, όπως ήδη αναφέρθηκε πιο πάνω, την αξιολόγηση της μακροχρόνιας συσσωρευτικής έκθεσης του ανθρώπου σε ένα ευρύ φάσμα οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων σε μια μόνο ανάλυση, γεγονός που καθιστά την αναλυτική μέθοδο πολύ σημαντική από πλευράς αποδοτικότητας ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται εξοικονόμηση χρόνου, κόπου και χρήματος.

Τα ευρήματα που προέκυψαν από την έρευνα τόσο στους ανθρώπους όσο και στα πειραματόζωα επιτρέπουν την εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου σε περαιτέρω έρευνες και κλινικές μελέτες, καθώς επίσης και σε μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες μη επαγγελματικά και επαγγελματικά εκτιθέμενων πληθυσμών προκειμένου να καταγραφεί και να αξιολογηθεί το μέγεθος της χρόνιας

έκθεσής τους στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα. Στις περιπτώσεις αυτές, η ανάλυση της τρίχας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική ή συμπληρωματική μέθοδο προς τις συμβατικές αναλύσεις του αίματος και των ούρων, καθώς δίνει ενδείξεις μακροπρόθεσμης έκθεσης και προσφέρει, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μια σειρά πολύ σημαντικών πλεονεκτημάτων έναντι των άλλων βιολογικών υλικών (σταθερότητα υποστρώματος, εύκολη και μη επεμβατική δειγματοληψία, απλός χειρισμός, εύκολη αποθήκευση).

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην εργασία αυτή θα μπορούσε επίσης να εφαρμοστεί (συμπεριλάβει) και στους άλλους DAP μεταβολίτες (DETP, DMDTP, DEDTP), χωρίς καθόλου ή με ελάχιστες τροποποιήσεις στις παραμέτρους λειτουργίας του συστήματος, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκθεση στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα.

Ωστόσο, παρά τα σημαντικά ευρήματα, το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι τα στάδια παραγωγοποίησης και καθαρισμού τα οποία είναι σχετικά χρονοβόρα. Αυτή η αναλυτική διαδικασία θα μπορούσε ίσως να βελτιωθεί περαιτέρω από πλευράς χρόνου και κόπου αν παραμερίζαμε το στάδιο παραγωγοποίησης χρησιμοποιώντας σύστημα LC-MS/(MS) αντί του GC-MS.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων και των προϊόντων αποικοδόμησής τους σε διάφορα βιολογικά υλικά θεωρείται μια αναγνωρισμένη και γενικά παραδεκτή μέθοδος παρακολούθησης της επαγγελματικής ή περιβαλλοντικής έκθεσης του ανθρώπου για την εκτίμηση του πιθανού κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία από την παρουσία των επικίνδυνων αυτών χημικών ουσιών στον οργανισμό και τη λήψη των απαραίτητων μέτρων πρόληψης.

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής αναπτύχθηκε μια καινούρια μέθοδος, που βασίζεται σε αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας, για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τριών DAP μεταβολιτών ενός ευρέους φάσματος οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων σε τρίχες. Η μέθοδος έχει βελτιστοποιηθεί για την ανάλυση των εξεταζομένων μεταβολιτών σε δείγματα τριχών κουνελιών και ανθρώπων.

Η μεθοδολογία που παρουσιάστηκε εμφανίζει ικανοποιητική επαναληπτικότητα, υψηλή ευαισθησία και καλές ανακτήσεις για μια τόσο περίπλοκη ανάλυση όπως είναι η ανάλυση υπολειμμάτων μεταβολιτών στην τρίχα και μάλιστα χωρίς να χρησιμοποιηθεί κανένα εσωτερικό πρότυπο. Η μεγάλη ευαισθησία του φασματομέτρου μάζας, στο οποίο στηρίζεται η προτεινόμενη μέθοδος, καθιστά δυνατή την ανίχνευση των υπό μελέτη ουσιών σε χαμηλά επίπεδα (ίσα ή μικρότερα από 0.10 ng mg^{-1}).

Παρά τα ικανοποιητικά αποτελέσματα που λαμβάνονται, η μέθοδος είναι πιθανό να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω κάνοντας χρήση ενός κατάλληλου εσωτερικού προτύπου και αυτό μένει να εξεταστεί στο μέλλον. Το επόμενο βήμα είναι να διερευνηθεί η τεχνική LC-MS/(MS) για την ανίχνευση των DAPs στις τρίχες. Αυτή η αναλυτική διαδικασία θα μπορούσε ίσως να βελτιωθεί περαιτέρω από πλευράς χρόνου και κόστους αν παραμερίζαμε το στάδιο παραγωγοποίησης χρησιμοποιώντας σύστημα LC-MS/(MS) αντί του GC-MS.

Η πειραματική μελέτη ανέδειξε ότι το επίπεδο της δόσης του χορηγούμενου φαρμάκου επηρεάζει σημαντικά τα ανιχνευόμενα επίπεδα των μεταβολιτών του, ενώ ανάμεικτα αποτελέσματα για τη σημαντικότητα της σχέσης μεταξύ της διάρκειας χορήγησης και των επιπέδων των δυο DAPs στην τρίχα παρατηρούνται. Το χρώμα

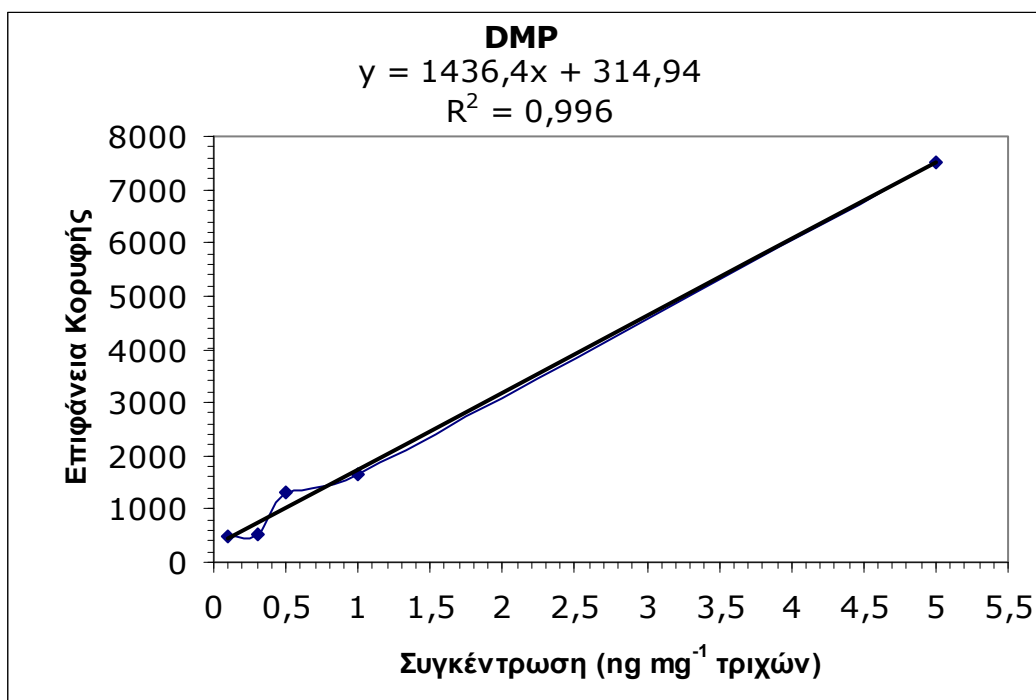
των μαλλιών δεν φαίνεται να επηρεάζει τις τιμές συγκέντρωσης του DMTP, ενώ φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην εναπόθεση του DMP. Ωστόσο, για να επιβεβαιωθούν τα συμπεράσματα που εξήχθησαν θα πρέπει να εξεταστεί ένας πολύ μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων από διάφορα είδη πειραματοζώων (κυρίως κουνέλια, ποντίκια ή αρουραίους) και να συγκριθούν τα πειραματικά δεδομένα από τα διάφορα είδη πειραματοζώων.

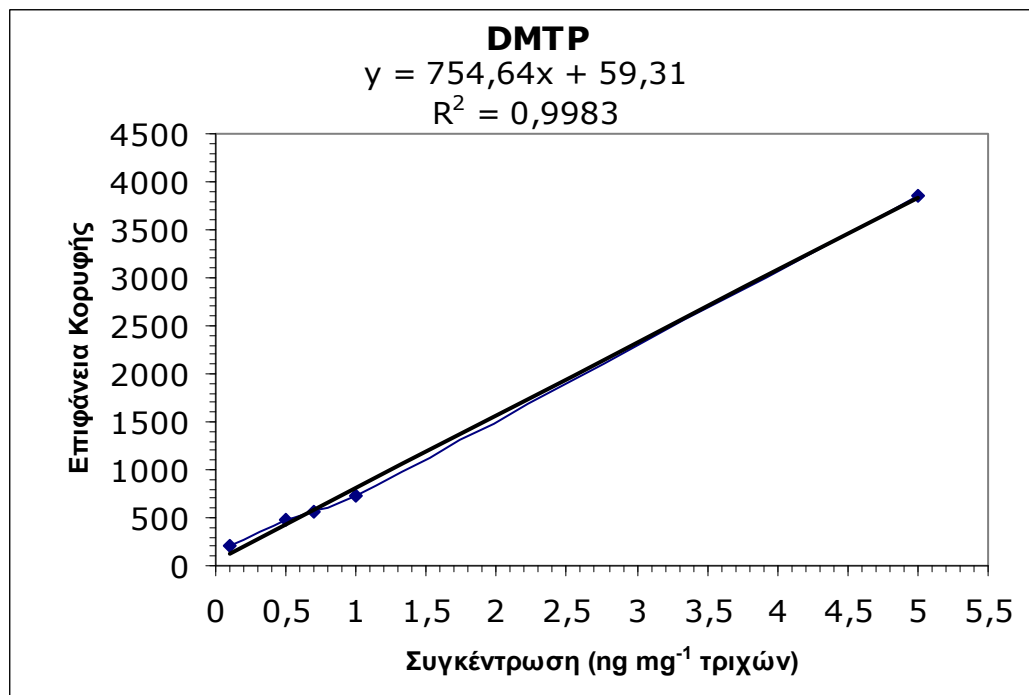
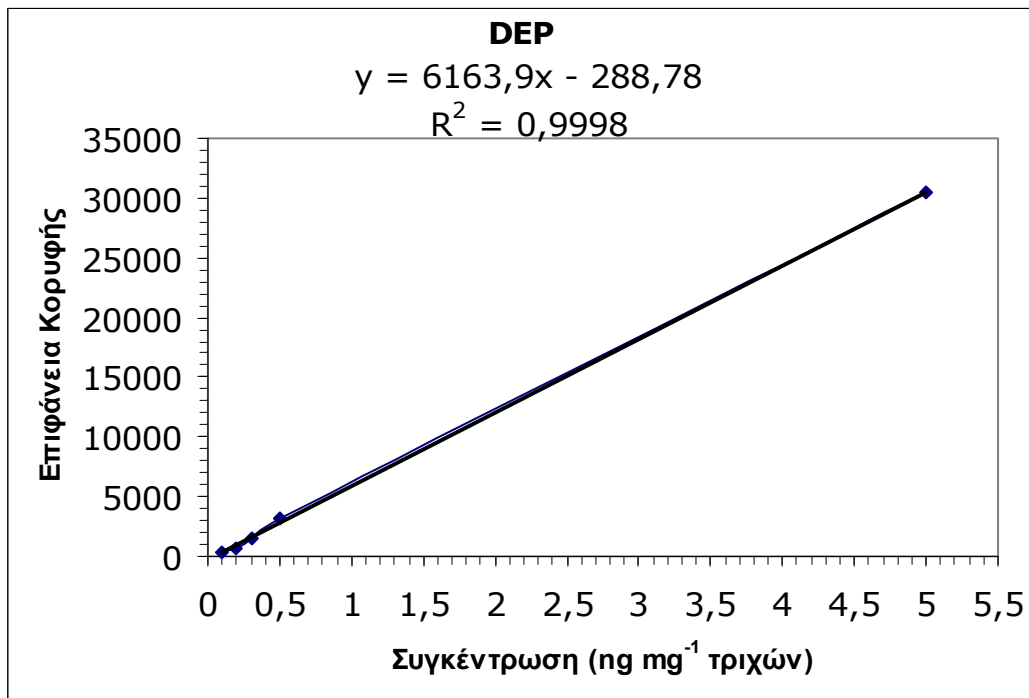
Τα αποτελέσματά μας συνηγορούν ότι η ανάλυση των DAPs στην τρίχα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της χρόνιας έκθεσης του οργανισμού στα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία θα μπορούσε να επιτρέψει την ανάλυση και των άλλων DAP μεταβολιτών (DETP, DMDTP και DEDTP), χωρίς καθόλου ή με ελάχιστες τροποποιήσεις στις παραμέτρους λειτουργίας του συστήματος. Μπορεί δηλαδή η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην εργασία αυτή να αποτελέσει τη βάση για μια μέθοδο ολοκληρωμένης ανάλυσης για την καταγραφή της συνολικής έκθεσης επαγγελματικά ή μη επαγγελματικά εκτιθέμενων πληθυσμών σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα σε επιδημιολογικές και άλλες κλινικές μελέτες.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

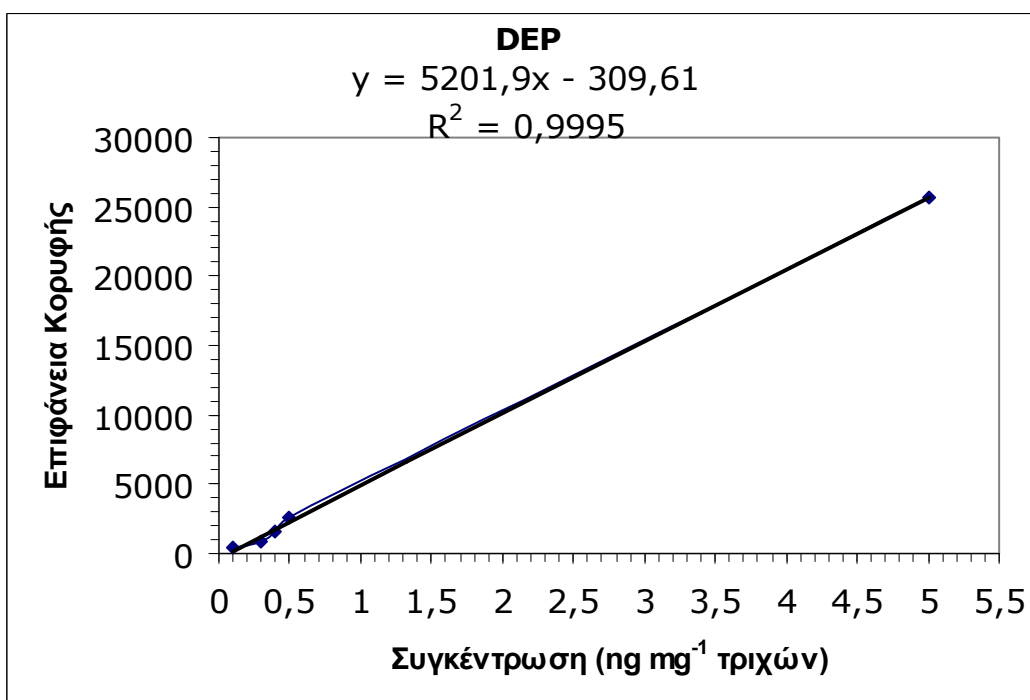
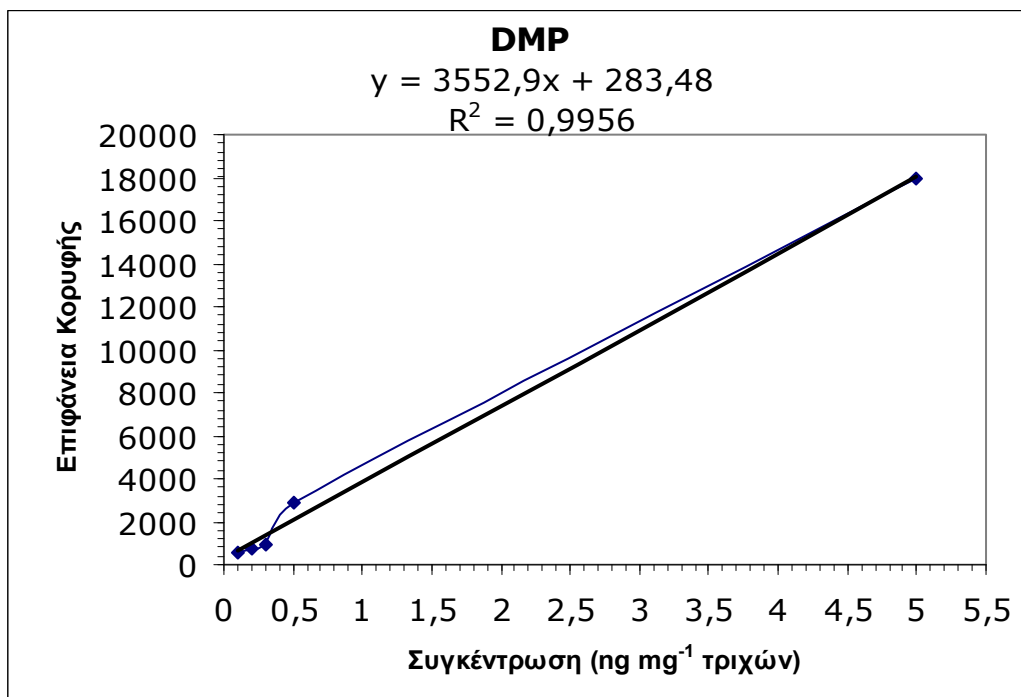
ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

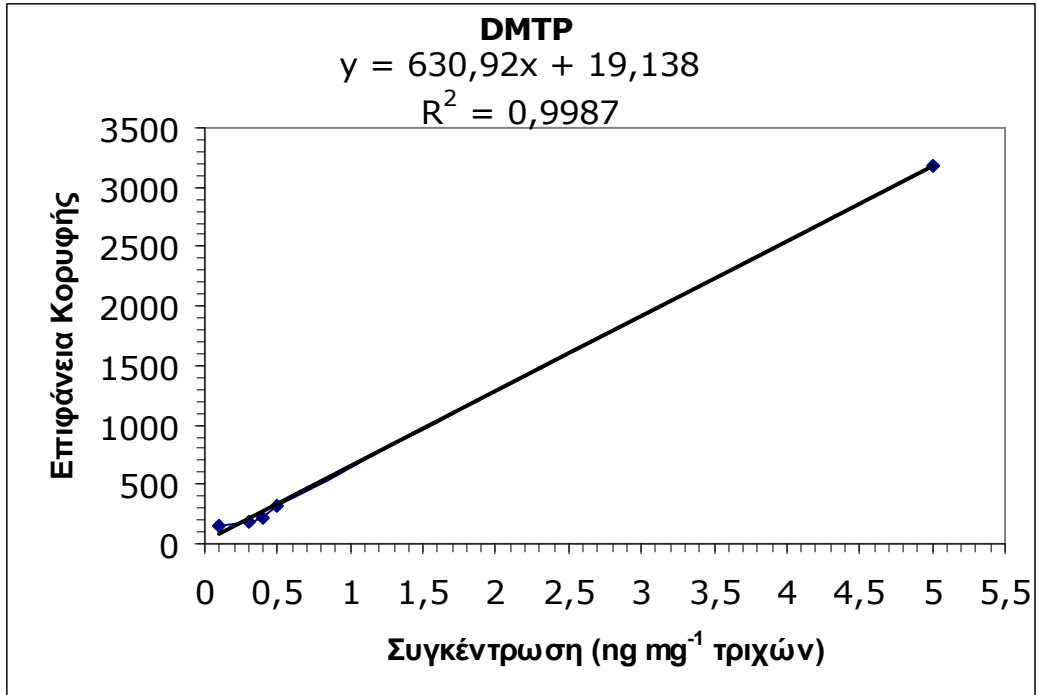
Α.1. Καμπύλες αναφοράς για τους υπό μελέτη μεταβολίτες (dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), dimethyl thiophosphate (DMTP)) σε τρίχες κουνελιών.





A.2. Καμπύλες αναφοράς για τους υπό μελέτη μεταβολίτες (dimethyl phosphate (DMP), diethyl phosphate (DEP), dimethyl thiophosphate (DMTP)) σε ανθρώπινες τρίχες.





ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αλμπάνης, Τ., 1999. "Ρύπανση και τεχνολογία προστασίας περιβάλλοντος", Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, pp. 84-95.

Δημητρίου, Α., 2001. "Αγωγή υγείας και περιβάλλοντος-Έκθεση και προστασία από τις επικίνδυνες ουσίες". Εκδόσεις: Ελληνικό Ινστιτούτο Υγιεινής και Ασφάλειας της Εργασίας, Αθήνα, pp. 1-90.

Εγκυκλοπαίδεια, Χρυσή υγεία της 3ης χιλιετίας, 2002. Εκδόσεις: Δομική, τόμος 10ος, pp. 113-128.

Ντολατζάς, Θ., 2005. "Ο γιατρός σας απαντά". Εκδόσεις: Δομική, pp. 75.

Aaron, C.K., Howland, M.A., 1998. Insecticides: Organophosphates and carbamates. In: Goldfrank, L.R., Flomenbaum, N.E., Lewin, N.A., et al. (Eds.), Goldfrank's toxicological emergencies. Stamford, C.T.: Appleton & Lange, 1429-1449.

Abend, Y., Goland, S., Evron, E., Sthoeger, Z.M., Geltner, D., 1994. Acute renal failure complicating organophosphate intoxication. Ren. Fail. 16, 415-417.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1997. Toxicological profile for chlorpyrifos. Atlanta, GA.

Balíková, M.A., Habrdová, V., 2003. Hair analysis for opiates: evaluation of washing and incubation procedures. J. Chromatogr. B 789, 93-100.

Ballantyne, B., Marrs, T.C. (Eds.), 1992. Overview of the biological and clinical aspects of organophosphates and carbamates. In: Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates. Oxford, Butterworth Heinemann, pp. 3-14.

Bardin, P.G., van Eeden, S.F., Moolman, J.A., Foden, A.P., Joubert, J.R., 1994. Organophosphate and carbamate poisoning. Arch. Intern. Med. 154, 1433.

Barr, D.B., Needham, L.L., 2002. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. *J. Chromatogr. B* 778, 5-29.

Barr, D.B., Bravo, R., Weerasekera, G., Calabiano, L.M., Whitehead Jr., R.D., Olsson, A.O., Caudill, S.P., Schober, S.E., Pirkle, J.L., Sampson, E.J., Jackson, R.J., Needham, L.L., 2004. Concentrations of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in the U.S. population. *Environ. Health Perspect.* 112, 186-200.

Barr, D.B., Angerer, J., 2006. Potential uses of biomonitoring data: a case study using the organophosphorus pesticides chlorpyrifos and malathion. *Environ. Health Perspect.* 114, 1763-1769.

Benfenati, E., Gini, G., Piclin, N., Roncaglioni, A., Vari, M.R., 2003. Predicting log *P* of pesticides using different software. *Chemosphere* 53, 1155-1164.

Betrosian, A., Balla, M., Kafiri, G., Kofinas, G., Makri, R., Kakouri, A., 1995. Multiple systems organ failure from organophosphate poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 33, 257-260.

Bicker, W., Lämmerhofer, M., Lindner, W., 2005. Determination of chlorpyrifos metabolites in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 822, 160-169.

Bielawski, D., Ostrea Jr., E., Posecion Jr., N., Corrion, M., Seagraves, J., 2005. Detection of several classes of pesticides and metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 62, 623-629.

Bradman, A., Barr, D.B., Claus Henn, B.G., Drumheller, T., Curry, C., Eskenazi, B., 2003. Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ. Health Perspect.* 111, 1779-1782.

Bravo, R., Driskell, W.J., Whitehead Jr., R.D., Needham, L.L., Barr, D.B., 2002. Quantitation of dialkyl phosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine using GC-MS-MS with isotopic internal standards. *J. Anal. Toxicol.* 26, 245-252.

Bravo, R., Caltabiano, L.M., Weerasekera, G., Whitehead, R.D., Fernandez, C., Needham, L.L., Bradman, A., Barr, D.B., 2004. Measurement of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in human urine using lyophilization with gas chromatography-tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 14, 249-259.

Corrion, M.L., Ostrea Jr., E.M., Bielawski, D.M., Posecion Jr., N.C., Seagraves, J.J., 2005. Detection of prenatal exposure to several classes of environmental toxicants and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry in maternal and umbilical cord blood. *J. Chromatogr. B* 822, 221-229.

Costa, L.G., Cole, T.B., Vitalone, A., Furlong, C.E., 2005. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin. Chim. Acta* 352, 37-47.

Curl, C.L., Fenske, R.A., Kissel, J.C., Shirai, J.H., Moate, T.F., Griffith, W., Coronado, G., Thompson, B., 2002. Evaluation of take-home organophosphorus pesticide exposure among agricultural workers and their children. *Environ. Health Perspect.* 110, 787-792.

Curwin, B.D., Hein, M.J., Sanderson, W.T., Barr, D.B., Heederik, D., Reynolds, S.J., Ward, E.M., Alavanja, M.C., 2005. Urinary and hand wipe pesticide levels among farmers and nonfarmers in Iowa. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 15, 500-508.

Davies, J.E., Peterson, J.C., 1997. Surveillance of occupational, accidental, and incidental exposure to organophosphate pesticides using urine alkyl phosphate and phenolic metabolite measurements. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 837, 257-268.

De Hoffmann, E., 1996. Tandem mass spectrometry: a primer. *J. Mass Spectrom.* 31, 129-137.

Dolapsakis, G., Vlachonikolis, I.G., Varveris, C., Tsatsakis, A.M., 2001. Mammographic findings and occupational exposure to pesticides currently in use on Crete. *Eur. J. Cancer* 37, 1531-1536.

Drevenkar, V., Štengl, B., Fröbe, Z., 1994. Microanalysis of dialkylphosphorus metabolites of organophosphorus pesticides in human blood by capillary gas chromatography and by phosphorus-selective and ion trap detection. *Anal. Chim. Acta* 290, 277-286.

Duggan, A., Charnley, G., Chen, W., Chukwudebe, A., Hawk, R., Krieger, R.I., Ross, J., Yarborough, C., 2003. Di-alkyl phosphate biomonitoring data: assessing cumulative exposure to organophosphate pesticides. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 382-395.

Dulaurent, S., Saint-Marcoux, F., Marquet, P., Lachâtre, G., 2006. Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 831, 223-229.

Eddleston, M., Eyer, P., Worek, F., Mohamed, F., Senarathna, L., von Meyer, L., Juszczak, E., Hittarage, A., Azhar, S., Dissanayake, W., Sheriff, M.H., Szinicz, L., Dawson, A.H., Buckley, N.A., 2005. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. *Lancet* 366, 1452-1459.

Ellenhorn, M.J., Barceloux, D.G., 1988. *Medical toxicology-diagnosis and treatment of human poisoning*. Elsevier, New York, pp. 1074-1075.

Exttoxnet (Extension Toxicology Network), 1996. Dimethoate. Pesticide Information Profiles. A Pesticide Information Project of Cooperative Extension Offices of Cornell University, Oregon State University, the University of Idaho, the University of California at Davis and Michigan State University.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2005. *FAO Specifications and Evaluations for Dimethoate*, pp. 1-27.

- Fenske, R.A., Lu, C., Barr, D., Needham, L., 2002. Children's exposure to chlorpyrifos and parathion in an agricultural community in central Washington State. *Environ. Health Perspect.* 110, 549-553.
- Gallo, M.A., Lawryk, N.J., 1991. Organic phosphorus pesticides. In: Hayes Jr., W.J., Laws Jr., E.R. (Eds.), *Handbook of pesticide toxicology, Classes of pesticides*, vol. 2. Academic Press, San Diego (Chapter 16).
- Garrett, E.R., 1987. Toxicokinetics. In: Tardiff, R.G., Rodricks, J.V. (Eds.), *Toxic substances and human risk*. Plenum Press, London, pp. 153-237.
- Hardt, J., Angerer, J., 2000. Determination of dialkyl phosphates in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 24, 678-684.
- Hatjian, B.A., Mutch, E., Williams, F.M., Blain, P.G., Edwards, J.W., 2000. Cytogenetic response without changes in peripheral cholinesterase enzymes following exposure to a sheep dip containing diazinon in vivo and in vitro. *Mutat. Res.* 472, 85-92.
- Haywood, P.T., Karalliedde, R.D., 2000. Management of poisoning due to organophosphorus compounds. *Current Anesth. & Crit. Care* 11, 331-337.
- He, F., Chen, S., Tang, X., Gan, W., Tao, B., Wen, B., 2002. Biological monitoring of combined exposure to organophosphates and pyrethroids. *Toxicol. Lett.* 134, 119-124.
- Hernández, F., Sancho, J.V., Pozo, O.J., 2002. Direct determination of alkyl phosphates in human urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1766-1773.
- Hernández, F., Sancho, J.V., Pozo, O.J., 2004. An estimation of the exposure to organophosphorus pesticides through the simultaneous determination of their main metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 808, 229-239.

Heudorf, U., Angerer, J., 2001. Metabolites of organophosphorous insecticides in urine specimens from inhabitants of a residential area. *Environ. Res.* 86, 80-87.

Hogendoorn, E., van Zoonen, P., 2000. Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *J. Chromatogr. A* 892, 435-453.

IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1989. Environmental Health Criteria 90: Dimethoate. WHO (World Health Organization), Geneva.

IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1992. Dimethoate Health and Safety Guide. Health and Safety Guide No. 20. WHO (World Health Organization), Geneva.

IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1996. Dimethoate (Pesticide residues in food: 1996 evaluations Part II Toxicological). Pesticides Safety Directorate, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Mallard House, Kings Pool, York, United Kingdom.

Joseph Jr., R.E., Su, T.P., Cone, E.J., 1996. In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to Caucasoid and Africoid hair. *J. Anal. Toxicol.* 20, 338-344.

Kamijima, M., Hibi, H., Gotoh, M., Taki, K., Saito, I., Wang, H., Itohara, S., Yamada, T., Ichihara, G., Shibata, E., Nakajima, T., Takeuchi, Y., 2004. A survey of semen indices in insecticide sprayers. *J. Occup. Health* 46, 109-118.

Kelly, R.C., Mieczkowski, T., Sweeney, S.A., Bourland, J.A., 2000. Hair analysis for drugs of abuse. Hair color and race differentials or systematic differences in drug preferences? *Forensic Sci. Int.* 107, 63-86.

Koch, H.M., Angerer, J., 2001. Analysis of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in urine samples from the general population using gas chromatography-mass spectrometry after steam distillation and solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* 759, 43-49.

Lacassie, E., Marquet, P., Gaulier, J., Dreyfuss, M., Lachâtre, G., 2001. Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology. *Forensic Sci. Int.* 121, 116-125.

Lifshitz, M., Shahak, E., Bolotin, A., Sofer, S., 1997. Carbamate poisoning in early childhood and in adults. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 35, 25-27.

Lifshitz, M., Shahak, E., Sofer, S., 1999. Carbamate and organophosphate poisoning in young children. *Pediatr. Emerg. Care* 15, 102-103.

Liu, S., Pleil, J.D., 2002. Human blood and environmental media screening method for pesticides and polychlorinated biphenyl compounds using liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. B* 769, 155-167.

Loewenherz, C., Fenske, R.A., Simcox, N.J., Bellamy, G., Kalman, D., 1997. Biological monitoring of organophosphorus pesticide exposure among children of agricultural workers in central Washington State. *Environ. Health Perspect.* 105, 1344-1353.

Lotti, M., 2001. Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In: Krieger, R.I. (Ed.), *Handbook of pesticide toxicology*. Academic Press, San Diego, pp. 1043-1085.

Lu, C., Fenske, R.A., Simcox, N.J., Kalman, D., 2000. Pesticide exposure of children in an agricultural community: evidence of household proximity to farmland and take home exposure pathways. *Environ. Res.* 84, 290-302.

Lu, C., Irish, R.M., Fenske, R., 2003. Biological monitoring of diazinon exposure using saliva in an animal model. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66, 2315-2325.

Mansour, S.A., 2004. Pesticide exposure-Egyptian scene. *Toxicology* 198, 91-115.

Margariti, M.G., Tsakalof, A.K., Tsatsakis, A.M., 2007. Analytical methods of biological monitoring for exposure to pesticides: recent update. *Ther. Drug Monit.* 29, 150-163.

Maroni, M., Ferioli, A., 1998. Biological Monitoring: Pesticides. Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, vol. 1, part IV (Chapter 27).

Mieczkowski, T., Newel, R., 2000. Statistical examination of hair color as a potential biasing factor in hair analysis. *Forensic Sci. Int.* 107, 13-38.

Milesion, B.E., Chambers, J.E., Chen, W.L., Dettbarn, W., Ehrich, M., Eldefrawi, A.T., Gaylor, D.W., Hamernik, K., Hodgson, E., Karczmar, A.G., Padilla, S., Pope, C.N., Richardson, R.J., Saunders, D.R., Sheets, L.P., Sultatos, L.G., Wallance, K.B., 1998. Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Sci.* 41, 8-20.

Miyazaki, T., Yashiki, M., Kojima, T., Chikasue, F., Ochiai, A., Hidani, Y., 1989. Fatal and non-fatal methomyl intoxication in an attempted double suicide. *Forensic Sci. Int.* 42, 263-270.

Montagna, W., Van Scott, E.J., 1958. The anatomy of the hair follicle. In: Montagna, W., Ellis, R.A. (Eds.), *The biology of hair growth*. Academic Press, New York.

Moreno Frías, M., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., Mateu Sánchez, M., Olea, F., Olea, N., 2001. Analyses of lindane, vinclozolin, aldrin, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT in human serum using gas chromatography with electron capture detection and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 760, 1-15.

Nakahara, Y., 1999. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J. Chromatogr. B* 733, 161-180.

Norrgran, J., Bravo, R., Bishop, A.M., Restrepo, P., Whitehead, R.D., Needham, L.L., Barr, D.B., 2006. Quantification of six herbicide metabolites in human urine. *J. Chromatogr. B* 830, 185-195.

Nutley, B.P., Cocker, J., 1993. Biological monitoring of workers occupationally exposed to organophosphorus pesticides. *Pestic. Sci.* 38, 315.

Oglobline, A.N., Elimelakh, H., Tattam, B., Geyer, R., O'Donnell, G.E., Holder, G., 2001. Negative ion chemical ionization GC/MS-MS analysis of dialkylphosphate metabolites of organophosphate pesticides in urine of non-occupationally exposed subjects. *Analyst* 126, 1037-1041.

Okamura, A., Kamijima, M., Shibata, E., Ohtani, K., Takagi, K., Ueyama, J., Watanabe, Y., Omura, M., Wang, H., Ichihara, G., Kondo, T., Nakajima, T., 2005. A comprehensive evaluation of the testicular toxicity of dichlorvos in Wistar rats. *Toxicology* 213, 129-137.

Olsson, A.O., Nguyen, J.V., Sadowski, M.A., Barr, D.B., 2003. A liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for quantification of specific organophosphorus pesticide biomarkers in human urine. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 808-815.

Olsson, A.O., Baker, S.E., Nguyen, J.V., Romanoff, L.C., Udunka, S.O., Walker, R.D., Flemmen, K.L., Barr, D.B., 2004. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides, and DEET in human urine. *Anal. Chem.* 76, 2453-2461.

O'Rourke, M.K., Lizardi, P.S., Rogan, S.P., Freeman, N.C., Aguirre, A., Saint, C.G., 2000. Pesticide exposure and creatinine variation among young children. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 10, 672-681.

Ostrea Jr., E.M., Morales, V., Ngoumnga, E., Prescilla, R., Tan, E., Hernandez, E., Ramirez, G., Cifra, H.L., Manlapaz, M., 2002. Prevalence of fetal exposure to environmental toxins as determined by meconium analysis. *Neurotoxicology* 23, 329-339.

Ostrea Jr., E.M., Villanueva-Uy, E., Bielawski, D.M., Posecion Jr., N.C., Corrion, M.L., Jin, Y., Janisse, J.J., Ager, J.W., 2006. Maternal hair-an appropriate matrix for detecting maternal exposure to pesticides during pregnancy. *Environ. Res.* 101, 312-322.

Ostrea Jr., E.M., Bielawski, D.M., Posecion Jr., N.C., Corrion, M., Villanueva-Uy, E., Jin, Y., Janisse, J.J., Ager, J.W., 2008. A comparison of infant hair, cord blood and meconium analysis to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environ. Res.* 106, 277-283.

Pappas, C.J., Kyriakidis, N.V., 2003. A comparison of dimethoate degradation in lemons and mandarins on the trees with two GC systems. *Food Chem.* 80, 23-28.

Pitarch, E., Serrano, R., López, F.J., Hernández, F., 2003. Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 189-197.

Posecion Jr., N., Ostrea Jr., E., Bielawski, D., Corrion, M., Seagraves, J., Jin, Y., 2006. Detection of exposure to environmental pesticides during pregnancy by the analysis of maternal hair using GC-MS. *Chromatographia* 64, 681-687.

Pragst, F., Balikova, M.A., 2006. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta* 370, 17-49.

Ray, D.E., 1998. Chronic effects of low level exposure to anticholinesterases-a mechanistic view. *Toxicol. Lett.* 102-103, 527-533.

Reid, S.J., Watts, R.R., 1981. A method for the determination of dialkyl phosphate residues in urine. *J. Anal. Toxicol.* 5, 126-132.

Richardson, E.R., Seiber, J.N., 1993. Gas chromatographic determination of organophosphorus insecticides and their dialkyl phosphate metabolites in liver and kidney samples. *J. Agric. Food Chem.* 41, 416-422.

Robbins, C.R., 1988. *Chemical and physical behavior of human hair*. Springer-Verlag, New York Inc.

Rollins, D.E., Wilkins, D.G., Krueger, G.G., Augsburger, M.P., Mizuno, A., O'Neal, C., Borges, C.R., Slawson, M.H., 2003. The effect of hair color on the incorporation of codeine into human hair. *J. Anal. Toxicol.* 27, 545-551.

Salvi, R.M., Lara, D.R., Ghisolfi, E.S., Portela, L.V., Dias, R.D., Souza, D.O., 2003. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Sci.* 72, 267-271.

Schramm, K.-W., 2008. Hair-biomonitoring of organic pollutants. *Chemosphere* 72, 1103-1111.

Slawson, M.H., Wilkins, D.G., Rollins, D.E., 1998. The incorporation of drugs into hair: relationship of hair color and melanin concentration to phencyclidine incorporation. *J. Anal. Toxicol.* 22, 406-413.

Steely, S., Amarasiriwardena, D., Jones, J., Yañez, J., 2007. A rapid approach for assessment of arsenic exposure by elemental analysis of single strand of hair using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchem. J.* 86, 235-240.

Tarbah, F.A., Kardel, B., Pier, S., Temme, O., Daldrup, T., 2004. Acute poisoning with phosphamidon: determination of dimethyl phosphate (DMP) as a stable metabolite in a case of organophosphate insecticide intoxication. *J. Anal. Toxicol.* 28, 198-203.

Thrasher, J.D., Heuser, G., Broughton, A., 2002. Immunological abnormalities in humans chronically exposed to chlorpyrifos. *Arch. Environ. Health* 57, 181-187.

Timchalk, C., Poet, T.S., Kousba, A.A., Campbell, J.A., Lin, Y., 2004. Noninvasive biomonitoring approaches to determine dosimetry and risk following acute chemical exposure: analysis of lead or organophosphate insecticide in saliva. *J. Toxicol. Environ. Health A* 67, 635-650.

Tsatsakis, A.M., Tsakalof, A.K., Siatitsas, Y., Michalodimitrakis, E.N., 1996a. Acute poisoning with carbamate pesticides: the Cretan experience. *Sci. Justice* 36, 35-39.

Tsatsakis, A.M., Tsakalof, A.K., Michalodimitrakis, E.N., 1996b. The analysis of methomyl, a carbamate pesticide, in post-mortem samples. *Sci. Justice* 36, 41-45.

Tsatsakis, A.M., Aguridakis, P., Michalodimitrakis, M.N., Tsakalof, A.K., Alegakis, A.K., Koumantakis, E., Troulakis, G., 1996c. Experiences with acute organophosphate poisonings in Crete. *Vet. Hum. Toxicol.* 38, 101-107.

Tsatsakis, A.M., Perakis, K., Koumantakis, E., 1996d. Experience with acute paraquat poisonings in Crete. *Vet. Hum. Toxicol.* 38, 113-117.

Tsatsakis, A.M., Tutudaki, M.I., Tzatzarakis, M.N., Psaroudakis, K., Dolapsakis, G.P., Michalodimitrakis, M.N., 1998. Pesticide deposition in hair: preliminary results of a model study of methomyl incorporation into rabbit hair. *Vet. Hum. Toxicol.* 40, 200-203.

Tsoutsis, C., Konstantinou, I., Hela, D., Albanis, T., 2006. Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* 573-574, 216-222.

Tutudaki, M., Tsakalof, A.K., Tsatsakis, A.M., 2003. Hair analysis used to assess chronic exposure to the organophosphate diazinon: a model study with rabbits. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 159-164.

Tutudaki, M., Tsatsakis, A.M., 2005. Pesticide hair analysis: development of a GC-NCI-MS method to assess chronic exposure to diazinon in rats. *J. Anal. Toxicol.* 29, 805-809.

Uematsu, T., Sato, R., Fujimori, O., Nakashima, M., 1990. Human scalp hair as evidence of individual dosage history of haloperidol: a possible linkage of haloperidol excretion into hair with hair pigment. *Arch. Dermatol. Res.* 282, 120-125.

Ueyama, J., Saito, I., Kamijima, M., Nakajima, T., Gotoh, M., Suzuki, T., Shibata, E., Kondo, T., Takagi, K., Miyamoto, K., Takamatsu, J., Hasegawa, T., Takagi, K., 2006.

Simultaneous determination of urinary dialkylphosphate metabolites of organophosphorus pesticides using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 832, 58-66.

U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency) Office of Pesticide Programs, 2006. Interim Reregistration Eligibility Decision for Dimethoate, pp. 1-63.

U.S. Public Health Service, 1995. Hazardous substances data bank. Washington, DC.

Vasilić, Ž., Drevenkar, V., Rumenjak, V., Štengl, B., Fröbe, Z., 1992. Urinary excretion of diethylphosphorus metabolites in persons poisoned by quinalphos or chlorpyrifos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 351-357.

Weiss, B., Amler, S., Amler, R.W., 2004. Pesticides. *Pediatrics*, 113, 1030-1036.

Wessels, D., Barr, D.B., Mendola, P., 2003. Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implications for a longitudinal study of children's environmental health. *Environ. Health Perspect.* 111, 1939-1946.

WHO (World Health Organization), 2001. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-2001. WHO/PCS/01.4, Geneva.

Whyatt, R.M., Barr, D.B., 2001. Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ. Health Perspect.* 109, 417-420.

Winchester, J.F., Gelfand, M.C., Knepshield, J.H., Schreiner, G.E., 1977. Dialysis and hemoperfusion of poisons and drugs-update. *ASAIO Trans.* 23, 762-842.

Zhang, H., Chai, Z., Sun, H., 2007. Human hair as a potential biomonitor for assessing persistent organic pollutants. *Environ. Int.* 33, 685-693.

Πηγές Internet

Γελαδάς, Κ., 1998. "Ελιά-λάδι. Ο ελαιώνας σαν οικοσύστημα: Φυτοφάρμακα". Available: <http://www.elia-diktyo.gr/Vivlia/Zante/19-29.pdf>

Κέντρο Δηλητηριάσεων Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Παιδών Αθηνών Π. & Α. Κυριακού, 1999. Επιδημιολογικά στοιχεία δηλητηριάσεων κατά το 1999. Available: http://www.aglaiakyriakou.gr/poison_b.html

Μαυροματίδης, Κ., 2009. "Νεφρός και δηλητηριάσεις". Available: <http://www.renalkomotini.gr/>

Kord, B., 2007. "Ανατομία και φυσιολογία τρίχας". Available: <http://www.bergmannkord.gr/>

Trump, R.A., EMT-P, 2001. An in-depth review of organophosphate poisoning. Available: <http://www.emsvillage.com/>

U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency) Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 2000. Toxicology chapter for chlorpyrifos. Washington, DC. Available: http://www.epa.gov/oppsrrd1/op/chlorpyrifos/rev_tox.pdf

Wikipedia, the free encyclopedia, 2009. Hair. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Hair/>

Δημοσιεύσεις στο θέμα του Διδακτορικού

Margariti, M.G., Tsatsakis, A.M., 2009. Analysis of dialkyl phosphate metabolites in hair using gas chromatography-mass spectrometry: a biomarker of chronic exposure to organophosphate pesticides. *Biomarkers* 14, 137-147.

Margariti, M.G., Tsatsakis, A.M., 2009. Assessment of long-term subacute exposure to dimethoate by hair analysis of dialkyl phosphates DMP and DMTP in exposed rabbits: the effects of dose, dose duration and hair colour. *Environ. Res.*, in press.